

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Campus Großhadern

Direktor: Prof. Dr. med. B. Göke

**TNFRSF19 als Zielgen des Wnt/ β -Catenin-Signalweges im
kolorektalen Karzinom:
Untersuchungen zu Expression, Regulation und Funktion**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Simon Tobias Schön

aus
München

2014

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichtersteller: Prof. Dr. Frank Kolligs

Mitberichtersteller: Prof. Dr. Andreas Jung
Prof. Dr. Stefan Endres
Prof. Dr. Gunnar Schotta
Prof. Dr. Uwe Schiemann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.05.2014

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|-----------|
| A | Zusammenfassung | 3 |
| B | Einleitung..... | 5 |
| B.1 | Karzinogenese | 5 |
| B.2 | Das kolorektale Karzinom | 6 |
| B.2.1 | Epidemiologische Bedeutung | 6 |
| B.2.2 | Risikofaktoren | 7 |
| B.2.3 | Kolorektale Karzinogenese | 8 |
| B.2.3.1 | Vogelstein-Modell..... | 8 |
| B.2.3.2 | Jass-Modell | 9 |
| B.2.3.3 | Übersicht der molekularen Karzinogenese | 9 |
| B.3 | Wnt-Signalweg | 11 |
| B.4 | Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor TNFRSF19 | 14 |
| C | Fragestellung und Zielsetzung | 17 |
| D | Material und Methoden..... | 18 |
| D.1 | Geräte und Materialien | 18 |
| D.1.1 | Geräte..... | 18 |
| D.1.2 | Chemikalien und Reagenzien | 19 |
| D.1.2.1 | Chemikalien und Materialien für molekular-biologische Techniken | 19 |
| D.1.2.2 | Chemikalien und Materialien für mikro-biologische Techniken | 20 |
| D.1.2.3 | Chemikalien und Materialien für zell-biologische Techniken | 21 |
| D.1.2.4 | Chemikalien und Materialien für protein-chemische Techniken..... | 21 |
| D.2 | Methoden | 23 |
| D.2.1 | Molekularbiologische Methoden | 23 |
| D.2.1.1 | Isolierung von DNA aus <i>E. coli</i> | 23 |
| D.2.1.2 | Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen | 23 |
| D.2.1.3 | Isolierung von RNA aus Kolonkarzinom-Biopsaten | 24 |
| D.2.1.4 | cDNA-Synthese (RT-PCR)..... | 24 |
| D.2.1.5 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 25 |
| D.2.1.5.1 | Allgemeines Prinzip und Standardbeding-ungen | 25 |
| D.2.1.5.2 | Konventionelle PCR | 26 |
| D.2.1.5.3 | Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)..... | 27 |
| D.2.1.5.4 | PCR für Klonierungen | 29 |
| D.2.1.5.5 | Site-directed mutagenesis..... | 31 |
| D.2.1.5.6 | Agarose-Gelelektrophorese | 33 |
| D.2.1.6 | Klonierung von DNA-Fragmenten | 33 |
| D.2.1.6.1 | Vektoren und Einsätze | 33 |
| D.2.1.6.2 | Enzymatischer Verdau mit Restriktions-endonukleasen | 34 |
| D.2.1.6.3 | Ligation..... | 35 |
| D.2.1.7 | DNA-Sequenzierung | 35 |
| D.2.1.8 | Reportergen Assay | 36 |
| D.2.2 | Mikrobiologische Methoden | 37 |
| D.2.2.1 | Transformation kompetenter <i>Escherichia Coli</i> Bakterien..... | 37 |
| D.2.2.2 | Lagerung der <i>E. coli</i> Stämme | 38 |
| D.2.3 | Zellbiologische Methoden..... | 38 |
| D.2.3.1 | Zelllinien..... | 38 |
| D.2.3.2 | Splitten konfluenter Zellen | 39 |
| D.2.3.3 | Zellzahlbestimmung | 39 |
| D.2.3.4 | Transfektion von Plasmid-DNA..... | 39 |
| D.2.3.5 | RNA-Interferenz | 40 |
| D.2.4 | Proteinchemische Methoden | 41 |

| | |
|---|-----------|
| D.2.4.1 Isolierung von Zytoplasmaproteinen | 41 |
| D.2.4.2 Proteinnachweis mittels Western Blot..... | 41 |
| E Ergebnisse..... | 43 |
| E.1 Identifizierung von Wnt/β-Catenin-Zielgenen..... | 43 |
| E.1.1 DNA Microarray..... | 43 |
| E.1.2 Zielgenvalidierung..... | 44 |
| E.2 Expressionsanalyse..... | 45 |
| E.2.1 Überexpression von TNFRSF19 in kolorektalen Karzinomzelllinien | 45 |
| E.2.2 Überexpression von TNFRSF19 in Gewebe aus primären Kolonkarzinomen ... | 46 |
| E.3 Charakterisierung des Promotors von TNFRSF19.1 | 48 |
| E.3.1 Klonierung von Reportergenkonstrukten..... | 48 |
| E.3.2 Konstrukte 1A – 1E | 49 |
| E.3.2.1 Konstrukte 1A – 1E im Reportergen Assay..... | 50 |
| E.3.3 Mutagenese der TCF4-Bindestellen im Fragment 1E..... | 52 |
| E.3.3.1 Reportergen Assay mit den mutierten Konstrukten von 1E nach Kotransfektion von β -Catenin und TCF4 | 52 |
| E.3.3.2 Reportergen Assay mit den mutierten Konstrukten von 1E nach <i>knockdown</i> von β -Catenin in kolorektalen Karzinomzelllinien..... | 53 |
| E.3.4 Konstrukte 1Ea – 1Ee | 54 |
| E.3.4.1 Reportergen Assay mit den Konstrukten 1Ea – 1Ee nach Kotransfektion von β -Catenin und TCF4..... | 55 |
| E.3.5 Mutationskonstrukte von 1Ee | 56 |
| E.3.5.1 Reportergen Assay mit den mutierten Konstrukten von 1Ee nach Kotransfektion von β -Catenin und TCF4 | 56 |
| E.4 Einfluß von TNFRSF19 auf den NF-κB-Signalweg..... | 57 |
| E.4.1 Klonierung und Überexpression von TNFRSF19.1 und TNFRSF19.2..... | 57 |
| E.4.2 Überexpression von TNFRSF19.1 und TNFRSF19.2 aktiviert den NF- κ B-Signalweg..... | 58 |
| E.4.3 <i>Knockdown</i> von TNFRSF19 reduziert die NF- κ B-Aktivität..... | 59 |
| E.4.4 dnTNFRSF19 inhibiert die NF- κ B-Aktivität..... | 60 |
| E.5 β-Catenin reguliert die NF-κB-Aktivität..... | 61 |
| F Diskussion | 63 |
| F.1 Expression von TNFRSF19 | 63 |
| F.2 Charakterisierung des Promotors von TNFRSF19.1..... | 64 |
| F.3 TNFRSF19 und der NF- κ B-Signalweg | 65 |
| F.4 Wnt/ β -Catenin und NF- κ B-Signalweg | 67 |
| F.5 NF- κ B-Signalweg und kolorektales Karzinom..... | 68 |
| F.6 Fazit | 69 |
| F.7 Ausblick | 70 |
| G Literaturverzeichnis..... | 71 |
| H Eidesstattliche Versicherung..... | 77 |

A Zusammenfassung

Bösartige Tumore stellen nach den Herz-Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. Das kolorektale Karzinom ist dabei hierzulande mit über 26.000 Todesfällen die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache. Durch intensive Forschungsbemühungen konnten in den vergangenen Jahrzehnten viele Einsichten und Erkenntnisse gewonnen werden über die zugrunde liegenden molekularbiologischen Ursachen und Mechanismen.

In ca. 70-80% der spontan auftretenden Fälle von kolorektalen Karzinomen liegt eine Deregulation des Wnt-Signalweges vor, am häufigsten ausgelöst durch Mutation und Allelverlust im *APC*-Tumorsuppressorgen. Als Folge hiervon akkumuliert intrazellulär der Transkriptionsfaktor β -Catenin. Dieser wird dann in den Zellkern transportiert und aktiviert dort zusammen mit Kofaktoren aus der TCF-LEF-Familie die Expression einer Vielzahl von Zielgenen. Die von diesen Genen vermittelten Funktionen sind es letztlich, welche in der Folge an der Entstehung von Adenomen beteiligt sind.

Wir haben TNFRSF19 als ein Gen identifiziert, welches im kolorektalen Karzinom durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg reguliert wird, und dieses im Hinblick auf seine Expression, Regulation und potenzielle Funktionen untersucht. Es zeigte sich, dass die TNFRSF19-Expression in der Mehrzahl der kolorektalen Karzinomzelllinien mit aktiviertem Wnt-Signalweg deutlich hochreguliert wird. Dabei werden beide bekannten Isoformen von TNFRSF19 durch β -Catenin in ihrer Expression reguliert. Im Promotor der Isoform 1 konnten wir eine Sequenz von 94 Basen identifizieren, die für die Regulation durch β -Catenin verantwortlich ist. Mutationen der darin enthaltenen kanonischen TCF4-Bindestellen blieben ohne Auswirkungen auf die Aktivierung im Reporter-gen Assay, weshalb wir für die Regulation durch β -Catenin einen indirekten Effekt vermuten. In weiterführenden Experimenten in unserer Arbeitsgruppe wurden zudem Promoterabschnitte der Isoform 2 analysiert, die für die β -Catenin-abhängige Regulation relevant sind. Wir konnten erstmals zeigen, dass beide Isoformen des humanen TNFRSF19 Gens in der Lage sind, den NF- κ B-Signalweg zu aktivieren. Damit ergibt sich eine neue Verbindung von β -Catenin und NF- κ B im kolorektalen Karzinom, indem β -Catenin über die Expression seines Zielgens TNFRSF19 die Aktivität des NF- κ B-Signalweges beeinflusst.

Als ein zentraler Signalweg des Immunsystems besitzt NF- κ B eine bedeutende Funktion für die Auslösung und Aufrechterhaltung von Entzündungsreaktionen. Ein Zusammenhang zwischen Entzündungen und der Entstehung bösartiger Tumore ist seit langem bekannt und auf molekularer Ebene nachgewiesen. Auch die fördernde Wirkung des NF- κ B-Signalweges

auf die Karzinogenese wurde bereits beschrieben. Die in dieser Dissertation vorgestellten Ergebnisse stellen TNFRSF19 als ein neues Zielgen des Wnt-Signalweges vor und verbessern das Verständnis darüber, wie Entzündungen und Darmkrebs auf molekularer Ebene miteinander verbunden sein könnten.

B Einleitung

B.1 Karzinogenese

In einem Verband gesunder Zellen herrscht unter physiologischen Bedingungen ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Zellwachstum (*Proliferation*), Zelltod (*Apoptose* oder *Nekrose*) und Differenzierung. Das Wachstumsverhalten der Zellen und ihr Eintritt in die Zellteilung (*Zellzyklus*) unterliegen dabei einer strikten genetischen Regulation. Als Folge genetischer Veränderungen kommt es im Rahmen der Krebsentstehung (*Karzinogenese*) zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichts zugunsten einer ungehemmten Proliferation solcher Zellen, die zusätzlich noch eine Reihe entscheidender Kontrollmechanismen überwunden haben.

Dieser Übergang einer gesunden, in ihrem Wachstum regulierten Zelle, zu einer bösartigen, unkontrolliert wachsenden Tumorzelle wird als maligne Transformation bezeichnet (Pühler et al., 2000).

Nach dem anerkannten Karzinogenese-Modell von Hanahan und Weinberg muss diese maligne Transformation als ein mehrstufiger Prozeß verstanden werden, in dessen Verlauf die Krebszelle charakteristische Eigenschaften erwirbt (Hanahan and Weinberg, 2000). Danach umfassen die Kennzeichen von Krebszellen folgende Merkmale, welche trotz der Diversivität verschiedenster Krebsarten als universal angesehen werden:

- fortgesetzte Proliferation der Krebszelle durch selbsterzeugte Wachstumssignale
- Desensibilisierung gegenüber wachstumshemmenden Signalen
- Resistenz gegenüber Apoptose
- unbegrenzte Teilungskapazität
- Fähigkeit zur Ausbildung neuer Gefäße zur eigenen Nährstoffversorgung
- Potential zur Gewebeinvasion und Metastasierung

In der Neuauflage ihres Modells aus dem Jahr 2011 (Hanahan and Weinberg, 2011) wurden diese Eigenschaften um weitere grundlegenden Prinzipien erweitert, die mit dem Erwerb und der Aufrechterhaltung aller Merkmale verbunden sind:

- die Karzinogenese fördernde Entzündungsprozesse
- genetische Instabilität
- die Fähigkeit, den Überwachungs- und Abwehrmechanismen des Immunsystems zu entkommen
- Umprogrammierung und Anpassung des Energie-Stoffwechsel

Zudem heben die Autoren zwei Sichtweisen besonders hervor, die sich durch Erkenntnisse der letzten Jahre verfestigt haben.

Zum einen handelt es sich bei bösartigen Tumoren nicht um homogene Zellhaufen proliferierender identischer Zellklone, sondern vielmehr um komplex organisierte und heterogene Zellverbände. Es finden vielfältige Interaktionen statt, sowohl zwischen den Tumorzellen untereinander als auch mit den umgebenden „gesunden“ Zellen. Mit dem an Bedeutung gewinnenden Konzept der Tumorstammzellen wird die Bedeutung dieses *tumor-microenvironments* unterstrichen.

Zum anderen besteht unter den beteiligten Signalwegen häufig eine ausgedehnte funktionelle Überlappung. Durch ein Netzwerk interagierender Signalwege kann der Ausfall einer bestimmten Funktion oftmals auf andere Weise kompensiert werden. So benennen die Autoren beispielsweise mindestens 10 Signalwege, die einen Anteil an der Deregulierung des Zellzyklus haben. Für therapeutische Ansätze ist dieses Phänomen von weitreichender Bedeutung und kann teilweise die Resistenz fortgeschrittener Tumore gegenüber Chemotherapeutika erklären.

B.2 Das kolorektale Karzinom

B.2.1 Epidemiologische Bedeutung

Epidemiologische Daten belegen die Bedeutung des kolorektalen Karzinoms (synonym: CRC für englisch *colorectal cancer*) als eine der häufigsten bösartigen Erkrankungen. Weltweit belegt es mit 1,2 Millionen Neuerkrankungen und 600.000 Sterbefällen Rang vier der krebisbedingten Todesursachen (Ferlay et al., 2010). In Deutschland lag die Zahl der Neuerkrankungen im Jahr 2008 nach Angaben des Robert Koch-Institutes bei rund 35.350 Männern und 30.040 Frauen. Damit hat Deutschland eine der höchsten Inzidenzraten in Europa (Ferlay et al., 2007). Statistisch bedeutet dies, dass in Deutschland 7,4 Menschen pro Stunde oder etwa alle 8 Minuten ein Mensch an einem kolorektalen Karzinom erkrankt. Das Lebenszeitrisiko beträgt 7,5% für Männer und 6,1% für Frauen. Mit über 26.000

Todesfällen stellt es hierzulande die zweithäufigste krebbsbedingte Todesursache dar. Für 2012 prognostizierte das Robert Koch-Institut insgesamt 69.400 Fälle, was gegenüber 2008 einen weiteren Anstieg um 6,1% bedeutet.

B.2.2 Risikofaktoren

In den letzten Jahrzehnten konnte eine Reihe von Faktoren identifiziert werden, die zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko führen. So ist der Einfluß von chronischen Entzündungen auf die Karzinogenese gut dokumentiert (Clevers, 2004; Itzkowitz and Yio, 2004; Ullman and Itzkowitz, 2011). Von den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist vor allem bei der Colitis ulcerosa eine deutliche Zunahme des Krebsrisikos belegt. Ist im Vollbild der Erkrankung der gesamte Dickdarm betroffen (sog. Pankolitis), so steigt die kumulative Inzidenz eines kolorektalen Karzinoms nach 20 Jahren auf 5-10% und nach 30 Jahren auf bis zu 20% (Ekbom et al., 1990). Zudem wird der Zusammenhang von Entzündungen und Darmkrebs durch die tumorpräventive Wirkung anti-entzündlicher Medikamente (Rostom et al., 2007) und den Einfluß mikrobieller Infektionen auf die Karzinogenese (Karin et al., 2006) unterstrichen.

Obwohl genetische Einflüsse zu den stärksten Risikofaktoren für ein kolorektales Karzinom zählen, beträgt der Anteil der hereditären CRC-Syndrome nur etwa 5%. Jedoch konnten die hierzu zählende familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre non-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) aufgrund ihres Modellcharakters entscheidend zum Verständnis der Pathogenese beim CRC beitragen (Kinzler and Vogelstein, 1996).

Zu den Umwelteinflüssen, welche die Wahrscheinlichkeit eines kolorektalen Karzinoms erhöhen, zählen mehrere Faktoren, die mit einem „westlichen“ Lebensstil verbunden werden (Chan and Giovannucci, 2010). So liegt die Inzidenzrate in Westeuropa und Australien/ Neuseeland um den Faktor 10 höher als in afrikanischen Staaten (ausgenommen Südafrika) (Ferlay et al., 2010). Hierfür werden unter anderem eine ballaststoffarme Ernährung, der Verzehr von viel rotem Fleisch, ein hoher Nikotin- und Alkoholkonsum, Adipositas und Diabetes mellitus verantwortlich gemacht.

B.2.3 Kolorektale Karzinogenese

B.2.3.1 Vogelstein-Modell

Die intestinalen Epithelien besitzen eine ausgeprägte Selbsterneuerungskapazität (Heath, 1996). Durch Proliferation von Stammzellen an der Basis der Darmkrypten erfolgt ein ständiger Ersatz der an der Oberfläche durch Abschilferung und Apoptose verloren gehenden Epithelzellen. Wird die strikte Kontrolle dieser Proliferation durch genetische Mutationen gestört, kommt es zunächst zur Entwicklung von Gewebewucherungen über das Schleimhautniveau (*Polypen*). Die Mehrzahl der kolorektalen Karzinome entwickelt sich über einen langen Zeitraum aus solchen Vorläuferläsionen, insbesondere aus den sog. adenomatösen Polypen oder Adenomen (Jass, 2007). Aufgrund der guten Beobachtungsmöglichkeiten mit Hilfe der Koloskopie ist der Zusammenhang zwischen Adenomen und dem späteren Auftreten von Karzinomen seit langem bekannt (Winawer et al., 1993). Bert Vogelstein stellte 1988 die Modellvorstellung auf, dass die molekulare Basis für die maligne Entartung dieser Polypen die Akkumulation von genetischen Mutationen in Vorläuferzellen ist (Vogelstein et al., 1988). Im Verlauf einer mehrstufigen Adenom-Karzinom-Sequenz gewinnen die onkogen mutierten Zellen einen selektiven Wachstumsvorteil gegenüber gesunden Zellen und erwerben die oben beschriebenen charakteristischen Eigenschaften von Krebszellen. Im Vogelstein-Modell wird dabei eine typische Abfolge von genetischen Veränderungen angenommen, innerhalb derer frühe Ereignisse wie der Allelverlust und die Mutation des APC-Gens unterschieden werden von späteren Ereignissen wie der Mutation des p53-Tumorsuppressorgens.

Dieses Modell hat in der Folge verschiedene Modifikationen und Ergänzungen erfahren. So muss heutzutage davon ausgegangen werden, dass es sich bei „Darmkrebs“ nicht um eine einzige Erkrankung mit einer spezifischen und klar definierten Pathogenese handelt, sondern vielmehr um eine Gruppe maligner Erkrankungen des Darmepithels, denen verschiedene und sich teilweise ergänzende Mechanismen zugrunde liegen (Issa, 2008).

So wird zunehmend auch die Rolle epigenetischer Veränderungen in den Prozeß der kolorektalen Karzinogenese integriert, wie zum Beispiel die Inaktivierung des Reparaturgens *hMLH1* aufgrund einer verstärkten Promotormethylierung (Tischoff and Tannapfel, 2008).

B.2.3.2 Jass-Modell

Als Ergänzung zum Vogelstein-Modell wurde von Jeremy R. Jass ein alternatives Modell aufgestellt (Jass et al., 2002; Jass, 2006). Darin wird betont, dass Darmkrebs eine heterogene Erkrankung darstellt, die neben der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz noch auf weiteren Pathogenese-Mustern beruht. Diese Entwicklungswege teilen aber bestimmte Grundstrukturen. So basiert dieses Modell ursprünglich auf zwei wesentlichen Markern, der DNA Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) und dem CpG-Insel Methylierungsphänotyp (CIMP) (Jass, 2007). Neben den klassischen histologischen Typen der Adenom-Karzinom-Sequenz werden diesem als *CIMP*- oder auch *serrated pathway* bezeichneten Mechanismus bis zu 30% der Kolonkarzinome zugeordnet (Young et al., 2007).

B.2.3.3 Übersicht der molekularen Karzinogenese

Auf molekularer Ebene wurden drei wesentliche Pathomechanismen identifiziert, die zur genomischen Instabilität beim kolorektalen Karzinom beitragen. Neben der chromosomalen Instabilität sind dies die Mikrosatelliteninstabilität sowie ein Phänotyp mit verstärkter Methylierung sogenannter CpG-Inseln in Promotorbereichen. Diese Mechanismen werden im Folgenden erläutert.

Chromosomale Instabilität

Chromosomale Instabilität (CIN) findet sich in 80 – 85% der kolorektalen Karzinome (Migliore et al., 2011). Sie resultiert aus Mutationen in Genen, die für DNA-Reparaturproteine kodieren. In der Folge können weitere Mutationen weniger effektiv repariert werden und es kommt gehäuft zu Chromosomenstrangbrüchen. Gleichzeitig erhöht sich die Empfindlichkeit gegenüber mutagenen Einflüssen. Beim Kolonkarzinom führt CIN zu Ungleichgewichten in der Anzahl ganzer Chromosome oder einzelner Chromosomenabschnitte. Ein weiteres Merkmal von Tumoren mit CIN ist die hohe Frequenz des Verlusts der Heterozygotie (*engl. loss of heterocygosity, LOH*) (Pino and Chung, 2010). Darunter wird ein Zustand verstanden, bei dem ein Allel eines Tumorsuppressorgens durch eine somatische Mutation beschädigt wird, nachdem zuvor bereits das andere Allel durch eine Keimbahnmutation inaktiviert worden war. CIN-positive Tumore sind mit der Akkumulation von Mutationen in einem

charakteristischen Set von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen verbunden. Dabei ist letztlich noch nicht geklärt, ob durch die chromosomale Instabilität erst die Bedingung für die Anhäufung dieser onkogenen Mutationen geschaffen wird oder es sich umgekehrt verhält. Als frühestes Ereignis in der kolorektalen Karzinogenese wird die Mutation von *APC* auf dem Genlocus 5q21 angeführt (Powell et al., 1992). In der Folge führt dies zur Aktivierung des Wnt-Signalweges, sowie auch zu Mutationen von *CTNNB1*. Weitere typische Defekte betreffen die Onkogene *KRAS*, *PIK3CA* sowie die Suppressorgene *TP53*, *DCC*, *SMAD4* und *SMAD2* (Migliore et al., 2011).

Mikrosatelliteninstabilität

Mikrosatelliteninstabilität (MSI) tritt in etwa 15% der sporadischen Kolonkarzinome auf. Als Mikrosatelliten oder *short tandem repeats* werden repetitive Sequenzen von 1 – 6 Basenpaaren bezeichnet, die besonders anfällig sind für Fehler in der DNA-Replikation. Lassen sich Längenveränderungen in diesen kurzen Sequenzen nachweisen, so kann man von Mutationen in sog. *missmatch repair* (MMR) Genen ausgehen. Am häufigsten betroffen sind hiervon die Gene *MLH1* und *MSH2* (Ionov et al., 1993; Geiersbach and Samowitz, 2011).

CpG-Insel Methylierungsphänotyp

Als CpG-Inseln werden Bereiche im Genom bezeichnet, welche durch eine statistisch erhöhte Dichte an Cytosin-Guanosin-Dinukleotiden gekennzeichnet sind. Sie befinden sich besonders häufig in Promotorbereichen. Sind die Cytidin-Basen in solchen CpG-Dinukleotiden methyliert, so kann dadurch die Transkription behindert werden. Durch Hypermethylierungen in den Promotoren von Tumorsuppressorgenen werden diese teilweise inaktiviert (Migliore et al., 2011). Eine eigene Untergruppe der kolorektalen Karzinome ist durch eine besonders hohe Frequenz an CpG-Insel-Methylierungen charakterisiert und wird als „CIMP+“ bezeichnet (Weisenberger et al., 2006). Diese Untergruppe umfasst zudem beinahe alle Fälle mit Mutationen im *BRAF* Onkogen. Sehr häufig besteht zusätzlich Mikrosatelliteninstabilität (MSI+), die aus CIMP-assoziierten Methylierungen im *MLH1* Gen resultiert.

Fasst man die molekularen Mechanismen der Karzinogenese wie beschrieben in diesen 3 Kategorien zusammen, so muss gleichzeitig betont werden, dass sich die Definitionen dieser *pathways* nicht komplett und scharf voneinander abgrenzen lassen. So kommt es zwischen ihnen durchaus zu teils redundanten Überschneidungen und Gemeinsamkeiten (Pino and

Chung, 2010). Beispielsweise weisen bis zu 25% der mikrosatelliteninstabilen Tumore auch chromosomale Instabilität auf (Sinicrope et al., 2006). Und während die meisten Karzinome mit MSI+/CIN- durch CIMP bedingt sind, findet sich ein hohes Maß an chromosomaler Instabilität bei bis zu 33% der CIMP positiven CRCs (Cheng et al., 2008).

B.3 Wnt-Signalweg

Entdeckung und Funktion

Vor 30 Jahren wurde der Wnt-Signalweg erstmals mit der Karzinogenese in Verbindung gebracht. Roel Nusse und Harold Varmus identifizierten das murine *Int-1* Gen als präferentielle Integrationsstelle des MMT-Virus in einem virus-assoziierten Brustkrebsmodell (Nusse and Varmus, 1982). Später fanden sich Sequenzhomologien des murinen Onkogens *Int-1* mit dem Wingless-Gen *Wg*, das erstmal bei der Larvenentwicklung der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben wurde. In der Terminologie der Vertebraten verschmolzen diese Begriffe zu *Wnt1* (Nusse et al., 1991). Für den Menschen wurden bislang 19 *Wnt* Gene identifiziert, die für eine Familie von sezernierten Glykoproteinen kodieren (Anastas and Moon, 2012).

Während der Embryonalentwicklung erfüllt der Wnt-Signalweg Funktionen für die Regulierung der Proliferation und Differenzierung von Stammzellen (Ilyas, 2005). Beeinträchtigungen des Wnt-Signalweges führen im Säugetiermodell und beim Menschen zu angeborenen Fehlbildungen (Liu et al., 1999; Niemann et al., 2004). Im adulten Organismus steuert er die Selbsterneuerung von Geweben in verschiedenen Organsystemen. Hierzu zählen unter anderem der Intestinaltrakt, das hämatopoietische System, die Knochen und das Haarfollikel (Clevers, 2006).

Signaltransduktion

Das initiale Ereignis in der Aktivierung der Wnt-Signalkaskade ist die Bindung von Wnt-Proteinen an *frizzled*-Rezeptoren. In der Folge werden 3 Signalwege aktiviert, die als kanonischer Wnt/ β -Catenin-Signalweg, nicht-kanonischer/PCP (*planar cell polarity*)-Signalweg oder Wnt/Calcium-Signalweg bezeichnet werden (Ilyas, 2005). In dieser Arbeit wird allein der kanonische Signalweg betrachtet, da er für die Entstehung von Krebserkrankungen die größte Relevanz besitzt und in diesem Kontext am gründlichsten erforscht wurde.

Durch die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges wird eine Kaskade von Reaktionen in Gang gesetzt, die eine Erhöhung der intrazellulären Spiegel von β -Catenin zur Folge hat. β -Catenin wird daraufhin aktiv in den Zellkern transportiert, wo es als Ko-Transkriptionsfaktor im Zusammenspiel mit weiteren Proteinen die Transkription einer Vielzahl von Zielgenen induziert. Diese Zielgene sind letztlich die Effektoren der Wnt-induzierten malignen Transformation und ihre anhaltende Aktivierung ist somit entscheidend für die Karzinogenese. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird der Zustand der Zielgenaktivierung im Folgenden als *on-state* bezeichnet. Demgegenüber entfaltet β -Catenin im *off-state* keine Wirkung als Transaktivator (Ilyas, 2005).

Off-state

Eine Inhibition der Expression von Wnt-Zielgenen kann durch extra- und intrazelluläre Mechanismen erreicht werden. Zu den extrazellulären Inhibitoren der Wnt-Proteine gehören die löslichen *sFRP* (*secreted frizzled related proteins*) (Jones and Jomary, 2002). Aufgrund von Sequenzhomologien mit den *frizzled*-Rezeptoren bilden sie sowohl Komplexe mit Wnt-Proteinen wie auch mit den *frizzled*-Rezeptoren selbst. Eine weitere Klasse von Wnt-Antagonisten bildet die Familie der *Dickkopf*-Proteine (*Dkk*), die ihre inhibierende Wirkung durch Bindung der Korezeptoren LRP5 und LRP6 (*low density lipoprotein receptor*) ausüben.

Intrazellulär wird der Spiegel des konstitutiv gebildeten β -Catenins in Abwesenheit von Wnt-Proteinen durch seinen kontinuierlichen Abbau sowie die Bindung an E-Cadherin kontrolliert. Der Abbau geschieht hauptsächlich über einen sog. *Destruction complex*, der sich aus dem Tumorsuppressorprotein APC, den Phospho-Kinasen *Glycogen Synthetase Kinase-3 β* (GSK3 β) und *Caseine Kinase-I* (CK1) sowie dem Bindeprotein Axin zusammensetzt (Rubinfeld et al., 1996; Clevers, 2006). Durch GSK3 β -vermittelte Phosphorylierungen wird dieser Komplex stabilisiert, was die nachfolgenden Phosphorylierungen am Amino-Terminus von β -Catenin ermöglicht. Das auf diese Weise mehrfach phosphorylierte β -Catenin wird vom *β -transducin repeat containing protein* (β -TrCP) erkannt und ubiquitinyliert. Daraufhin erfolgt der Abbau von β -Catenin durch das 26S-Proteasom (Ilyas, 2005).

β -Catenin selbst weist keine DNA-Bindedomäne auf und benötigt daher für seine Funktion als Transkriptionsfaktor die Interaktion mit *high mobility group* (HMG) Proteinen aus der TCF-LEF-Familie. Von den vier Mitgliedern LEF1, TCF1, TCF4 und TCF4 wird einzig TCF4 konstitutiv in kolorektalen Epithelzellen exprimiert (Rubinfeld et al., 1996; Clevers, 2006; Pino and Chung, 2010). An seiner DNA-Bindestelle (A|T)(A|T)CAA(A|T)G (Brantjes et al., 2002) komplexiert TCF4 mit der genomischen DNA und agiert in Abwesenheit von β -Catenin mit *Groucho* als Repressor der Transkription.

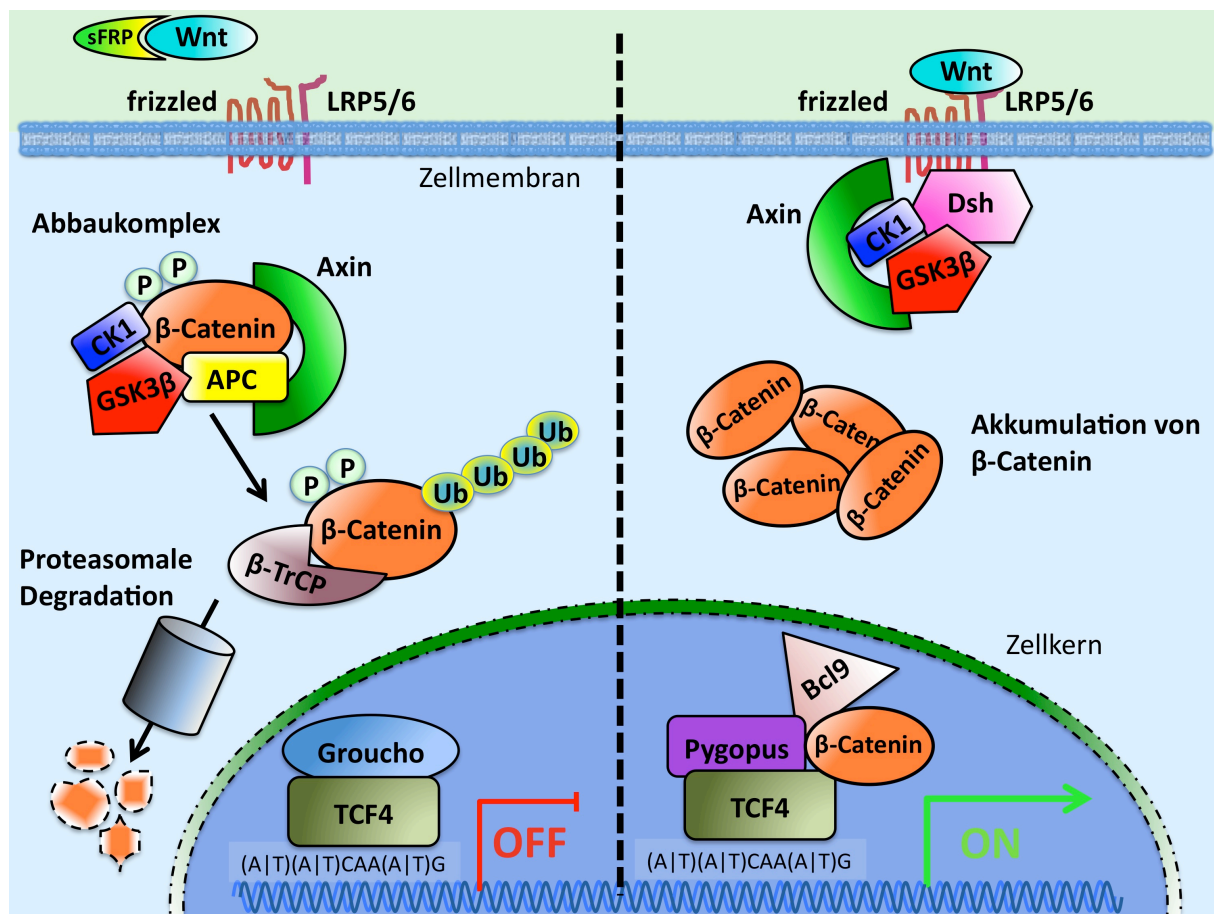


Abbildung B.1 Der kanonische Wnt-Signalweg in der Übersicht. Links: Der Wnt-Signalweg im *off-state*. Ohne die Bindung von Wnt-Proteinen an ihre Oberflächen-Rezeptoren kommt es in der Zelle zum Abbau von β -Catenin durch den sog. Abbaukomplex. Zudem wird ein Teil des ständig gebildeten β -Catenins von E-Cadherin an der Zelloberfläche gebunden (nicht dargestellt). Die Folge ist, dass TCF an spezifischen DNA-Bindestellen im Promotor ((A|T)(A|T)CAA(A|T)G) die Zielgenexpression inhibiert. „P“ symbolisiert Phosphorylierungen und „Ub“ Ubiquitinylierungen. **Rechts:** Im *on-state* akkumuliert β -Catenin als Folge des Wnt-Signals und der Hemmung des sog. Abbaukomplex in der Zelle. Es wird in den Zellkern transportiert und aktiviert dort als Ko-Faktor mit TCF4 die Zielgenexpression. [Abb. modifiziert nach Pino and Chung, 2010].

On-state

Die initiale Aktivierung des kanonischen Signalweges erfolgt durch Bindung von Wnt-Proteinen an *frizzled*- und LRP5/6-Rezeptoren. In der Folge kommt es zu einer Hemmung des *Destruction complex*. Dies geschieht zum einen durch die Rekrutierung des Proteins *dishevelled* (Dsh), welches einen Komplex mit der GSK3 β formiert. Hierdurch werden die GSK3 β -vermittelten Phosphorylierungen unterbunden, welche für die Stabilisierung des

Destruction complex nötig sind. Zum anderen begünstigt der Komplex aus Wnt-Proteinen, *frizzled*- und LRP5/6-Rezeptoren den Abbau des Bindeproteins Axin durch LRP5/6 (Mao et al., 2001). Als entscheidender Effekt aus der Bindung der Wnt-Proteine und der Hemmung des *Destruction complex* wird β -Catenin schließlich nur mehr vermindert abgebaut, reichert sich also intrazellulär an und wird in den Zellkern transportiert.

Dort verdrängt es den Transkriptions-Repressor *Groucho* aus der Bindung mit LEF/TCF. Im Komplex mit den LEF/TCF-Faktoren und über deren DNA-Bindestellen bindet β -Catenin an spezifische Promotorsequenzen. Dort steuert es mit Kofaktoren wie *Pygopus*, *Bcl9/legless* sowie weiteren Proteinen die spezifische Expression der sog. β -Catenin/TCF4-Zielgene.

Bemerkenswert ist, dass sich unter diesen Zielgenen mit *c-myc*, *c-jun*, *Sox9* unter anderem auch Transkriptionsfaktoren befinden, die die Wirkung von β -Catenin/TCF4 je nach zellulärem Kontext modifizieren und verstärken können. Eine vollständige Liste, der bislang identifizierten Zielgene und Wnt-Proteine findet sich auf der *Wnt-homepage* von Roel Nusse (<http://wnt.stanford.edu/>).

Ausgelöst durch die Wnt-aktivierenden Mutationen in den Genen APC und CTNNB1 ist dieser Signalweg an 70-80% der spontanen Fälle und an insgesamt ca. 40-50% aller Fälle von kolorektalen Karzinomen beteiligt (Bienz and Clevers, 2000; Fodde et al., 2001).

B.4 Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor TNFRSF19

Das Rezeptormolekül TNFRSF19 (für *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19*) ist ein Typ-1-Transmembranprotein (Hu et al., 1999). Als solche werden *Singlepass*-Membranproteine bezeichnet, deren Amino-Terminus extrazellulär liegt. Der systematische Name leitet sich ab aus seiner Zugehörigkeit zur *tumor necrosis factor receptor superfamily* (*TNF-R-superfamily*). Daneben existieren als weitere synonyme Bezeichnungen: TROY, TAJ, TRADE sowie TAJ-alpha.

Durch alternatives Spleißen kodiert das humane TNFRSF19 Gen für zwei Isoformen. Diese werden in dieser Arbeit als TNFRSF19.1 und TNFRSF19.2 bezeichnet. Die Unterschiede zwischen den Isoformen liegen zum einen im Bereich der Promoterregionen (siehe Abb. B.2). Dort zeichnet sich TNFRSF19.2 durch ein zusätzliches 5'-UTR-Exon aus. Der Translationsstart liegt dann bei beiden Isoformen in Exon3. Am 3'-Ende befindet sich das Stop-Codon von TNFRSF19.1 in Exon10, während das Stop-Codon von Isoform 2 in Exon11 liegt.

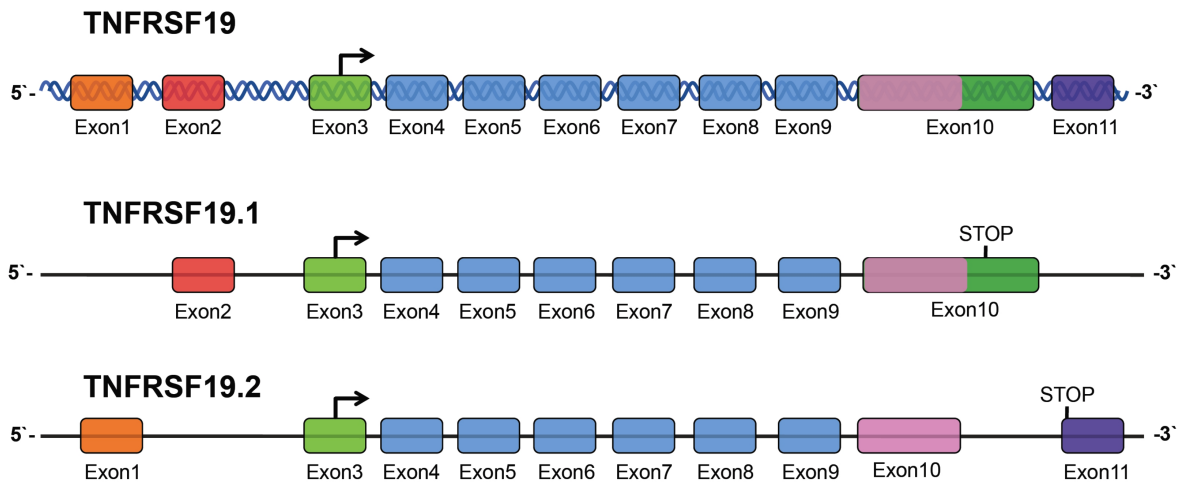


Abbildung B.2 Übersicht über die beiden Isoformen TNFRSF19.1 und TNFRSF19.2.
Oben ist das humane TNFRSF19 Gen dargestellt. Darunter die beiden Transkript-Varianten.

Auf Aminosäure-Ebene unterscheiden sich die Isoformen an ihren Carboxy-Termini. TNFRSF19.1 umfasst 423 Aminosäuren und endet auf –SLQVRQRLGSL. Demgegenüber ist TNFRSF19.2 mit 417 Aminosäuren insgesamt kürzer und endet auf –SLQEA. Zudem weist TNFRSF19.2 am Carboxy-Terminus eine TRAF-Bindestelle (SLQE) auf, die bei TNFRSF19.1 nicht vorhanden ist (Qiu et al., 2010).

Expression von TNFRSF19

In der Literatur wird beschrieben, dass TNFRSF19 während der Embryonalentwicklung der Maus stark exprimiert wird in den Epithelien der Epidermis sowie des Bronchial- und Intestinaltraktes (Kojima, 2000; Hisaoka, 2003). Nach der Geburt beschränkt sich die Expression in erster Linie auf Haar-Follikel und das Nervensystem. Untersuchungen der TNFRSF19 Expression beim Menschen zeigten allein in der Prostata hohe Spiegel, wohingegen Darmtrakt, Milz, Thymus, Hoden, Uterus und Leukozyten nur eine sehr niedrige Expression aufwiesen (Eby et al., 2000).

Zudem wurde über eine TNFRSF19 Expression bei verschiedenen bösartigen Tumoren berichtet. Dies gilt für das Maligne Melanom (Spanjaard et al., 2007), bei Glioblastomen (Paulino et al., 2010) sowie auch Nasopharynx-Karzinomen (Bei et al., 2010).

Funktionen

Die bislang beschriebenen Funktionen von TNFRSF19 ergeben ein uneinheitliches Bild. Im Nervensystem ist er als Ko-Rezeptor des p75/NgR1/Lingo-Komplexes an der Regeneration von Axonen beteiligt (Park et al., 2005; Shao et al., 2005; Mi, 2008). Zudem wird ihm auch eine Rolle bei vaskulären Demenzen (Kong et al., 2011), Multipler Sklerose (Sato et al., 2007; Avasarala et al., 2008) und der zerebralen Angiogenese (Tam et al., 2012) zugewiesen.

Darüber hinaus spielt er eine Rolle bei der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (Qiu et al., 2010). In HEK293-Zellen wurde eine Beteiligung an einer alternativen Form des Zelltodes beschrieben (Wang et al., 2004).

Als möglicher Mechanismus zur Transduktion der Funktionen von TNFRSF19 wurde aufgrund seiner Zugehörigkeit zur TNF-Rezeptorsuperfamilie die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges untersucht. Kojima (2000) und Hashimoto (2008) zeigten, dass die Überexpression von murinem TNFRSF19 zu einer Aktivierung dieses Signalweges führte.

C Fragestellung und Zielsetzung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Rolle des Rezeptormoleküls TNFRSF19 als Zielgen des Wnt/ β -Catenin-Signalweges im kolorektalen Karzinom untersucht.

In Vorarbeiten hatte die Arbeitsgruppe Molekulare Gastroenterologie (Leitung: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Kolligs, Klinikum Großhadern) in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Helmut Blum (Laboratory for Functional Genome Analysis, Genzentrum der Universität München) TNFRSF19 als einen Zielgenkandidaten des Wnt-Signalweges identifiziert. Im DNA-Mikroarray-Experiment nach siRNA-vermitteltem *Knockdown* von β -Catenin hatte sich eine β -Catenin-abhängige Regulation von TNFRSF19 in den kolorektalen Karzinomzelllinien SW480 und DLD1 gezeigt. Die Auswahl von TNFRSF19 für das hier vorgestellte Projekt erfolgte aufgrund dieser Regulation und seiner Zugehörigkeit zur Familie der TNF-Rezeptoren. *OPG*, ein weiteres Mitglied aus dieser Rezeptoren-Familie, war in einem früheren Projekt derselben Arbeitsgruppe auf die gleiche Weise identifiziert und untersucht worden (De Toni et al., 2008).

Die Untersuchung der Rolle von TNFRSF19 gliederte sich in drei Bereiche:

- die **Expression** von TNFRSF19 in kolorektalen Karzinomzelllinien wurde mittels qRT-PCR analysiert
- für die weitere Aufklärung der **Regulation** wurden Bereiche aus dem Promotor der Isoform 1 von TNFRSF19 im Reporter-gen Assay untersucht. Um die Bedeutung einzelner TCF-Bindestellen zu bestimmen wurden diese per *site-directed mutagenesis* mutiert
- Mitglieder der TNF-Rezeptorensuperfamilie vermitteln ihre **Funktion** häufig über die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges. Für murines TNFRSF19 ist dies bereits beschrieben. Wir benutzten ein NF- κ B-Luziferase-Reporter-genkonstrukt um zu überprüfen, ob die beiden humanen TNFRSF19 Isoformen ebenfalls den NF- κ B-Signalweg aktivieren und somit eine Verbindung zwischen β -Catenin und NF- κ B herstellen.

D Material und Methoden

D.1 Geräte und Materialien

D.1.1 Geräte

Tabelle D.1

| Gerät | Hersteller |
|--|---|
| Autoklaviergerät Wolf Autoclave | Wolf Laboratories Limited, Packlington, USA |
| Blotting Zubehör Mini Trans-Blot Cell | BioRad Laboratories Inc., München |
| Brutschrank Heraeus HERAcell 240 | Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co.KG, Bonn |
| Brutschrank Plus II Incubator | Weiss-Gallenkamp, Leightonbrough, Großbritannien |
| DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR | G.Kisker GbR, Steinfurt |
| Entwicklungsgerät CURIX 60 | Agfa-Gevaert Gruppe, München |
| Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 TV | Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen |
| Gelkammer WIDE MINI-SUB® Cell GT | BioRad Laboratories Inc., München |
| Heizblock Techne DRI-Block® DB 2A | Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Großbritannien |
| Lichtmikroskop IX50-S8F | Olympus Deutschland GmbH, Hamburg |
| Luminometer Orion II Microplate Luminometer | Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim |
| Magnetrührer COMBIMAG RCO RCT basic IKAMAG safety control | ELMI Ltd., Riga, Lettland IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen |
| 96-Well ELISA Microplate | Greiner Bio One, Frickenhausen |
| LUMITRAC 600 Microplate | Greiner Bio One, Frickenhausen |
| Microplate Lesegerät Easy Reader SF Plus | SLT Lab Instruments, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz |
| Neubauer Zählkammer | GFL GmbH, Burgwedel |
| PCR-Geräte Corbett Rotorgene RG-3000 PTC-200 Thermo Cycler | Qiagen, Hilden MJ Research Inc., Watham, USA |
| pH-Meter inoLab pH720 | WTW GmbH, Weilheim |
| Photometer Ultrospec 3100pro | GE Healthcare, München |
| Schüttler SHAKER DRS-R KS 15A control | ELMI Ltd., Riga, Lettland Edmund Bühler GmbH, Hechingen |
| SDS Page Zubehör "Mini-Protean Tetra Electrophoresis System | BioRad Laboratories Inc., München |
| Sicherheitswerkbank Heraeus HERAsafe | Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co.KG, Bonn |
| Stromgerät PowerPac 200 | BioRad Laboratories Inc., München |
| Stromgerät PowerPac 300 | BioRad Laboratories Inc., München |
| UV-Kamera Multi Doc-It Transluminator M-20 | UVP Ltd., Cambridge, Großbritannien |
| Vortexer | |

| | |
|---|---|
| Vortex Genie™ Vortex Mixer VM-300 | Bender & Hobein AG, Bruchsal neoLab, Heidelberg |
| Waagen Modell 2254 EW4200-2NM | Sartorius AG, Göttingen Kern und Sohn GmbH, Balingen |
| Wasserbäder Modell 1003 Modell U3 | GFL GmbH, Burgwedel Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach |
| Wasserfiltrationssystem Milli-Q Advantage A10 System | Millipore GmbH, Schwalbach/Ts. |
| Zentrifugen miniSpin Rotina 46 Centrifuge & Vortex Vortexzentrifuge, Centrifuge & Vortex CM- 70M.09 Kühlzentrifuge Centrifuge 5417R | Eppendorf AG, Hamburg A.Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen neoLab, Heidelberg ELMI Ltd., Riga, Lettland Eppendorf AG, Hamburg |

D.1.2 Chemikalien und Reagenzien

D.1.2.1 Chemikalien und Materialien für molekular- biologische Techniken

Tabelle D.1

| Chemikalie | Hersteller |
|---|--|
| 2x-β-Galaktosidase Puffer: <ul style="list-style-type: none"> • 120mM Na₂HPO₄ • 80mM NaH₂PO₄ • 2mM MgCl • 100mM 2-Mercaptoethanol • 133mg/mL Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid | Sigma-Aldrich, Steinheim Carl Roth, Karlsruhe Carl Roth, Karlsruhe Carl Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Steinheim |
| 50xTAE Puffer : <ul style="list-style-type: none"> • 242g Trisma Base • 57,1mL Essigsäureanhydrid • 100mL 0,5M EDTA pH 8,0 • ad 1000mL gefiltertes Wasser | Sigma-Aldrich, Steinheim Carl Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Steinheim |
| 6x Orange Loading DNA Loading Dye | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Agarose | Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf |
| DNase I, Amplification Grade | Invitrogen, Karlsruhe |
| dNTP Mix 10mM | PeqLab, Erlangen |
| Ethanol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Formaldehydlösung 37% ROTIPURAN® | Carl Roth, Karlsruhe |
| HiYield® Plasmid Mini Kit | SLG, Süd-Laborbedarf, Gauting |
| HotStarTaq® DNA Polymerase | Qiagen, Hilden |
| Isopropanol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer | Promega, Mannheim |

| | |
|--|--|
| Nucleo C+T Kit | Machery-Nagel, Düren |
| NucleoSpin Plasmid QuickPure | Machery-Nagel, Düren |
| NucleoSpin® Extract II Kit | Machery-Nagel, Düren |
| O'Gene Ruler™ 1kb Plus DNA Ladder | Fermentas, St. Leon-Rot |
| p106 NF-κB Reporter Plasmid | Arbeitsgruppe Rust, Medizinische Klinik und Poliklinik II, Klinikum Großhadern |
| Paq5000™ DNA Polymerase | Agilent, Böblingen |
| Parafin Roti®-Plast | Carl Roth, Karlsruhe |
| pcDNA3™-Vektor | Invitrogen, Karlsruhe |
| pCH110 β-Galaktosidase Reporter Plasmid | Amersham Biosciences, München |
| Phusion® HotStart DNA Polymerase | Finnzymes, Fisher Scientific, Schwerte |
| pTOPFlash-Reporter | Randall T. Moon, University of Washington, USA |
| pUC19 DNA | Invitrogen, Karlsruhe |
| QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit | Agilent, Böblingen |
| Restriktionsenzyme | Fermentas, St. Leon-Rot New England Biolabs, Frankfurt |
| SuperScript™ First Strand Synthesis System | Invitrogen, Karlsruhe |
| SYBR® Green I | Life Technologie, Darmstadt Lonza Cologne GmbH, Köln |
| T4-DNA-Ligase | Fermentas, St. Leon-Rot |
| TriFast™ Reagent | PeqLab, Erlangen |

D.1.2.2 Chemikalien und Materialien für mikrobiologische Techniken

Tabelle D.2

| Chemikalie | Hersteller |
|--|---------------------------|
| Ampicillin Natriumsulfat | Carl Roth, Karlsruhe |
| Chloramphenicol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Glycerin ROTIPURAN® | Carl Roth, Karlsruhe |
| Kanamycinsulfat | Carl Roth, Karlsruhe |
| LB (Lennox) Agar | Carl Roth, Karlsruhe |
| LB Broth Base powder | Invitrogen, Karlsruhe |
| SOB-Medium | Carl Roth, Karlsruhe |
| SOC Medium: <ul style="list-style-type: none"> • SOB-Medium • 20mM Glucose | |
| Subcloning Efficiency™ DH5α™ competent E.coli | Invitrogen, Karlsruhe |
| XL-1 Blue competent Cells | Stratagene, La Jolla, USA |

D.1.2.3 Chemikalien und Materialien für zellbiologische Techniken

Tabelle 3

| Chemikalie | Hersteller |
|---|--|
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| DMEM High Glucose (4,5g/L) with L-Glutamine | PAA, Pasching, Österreich |
| RPMI-1640 Medium | PAA, Pasching, Österreich |
| McCoy's 5A Medium | PAA, Pasching, Österreich |
| Doxycyclin | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Dulbecco's PBS without Mg + Ca | PAA, Pasching, Österreich |
| Fetal Bovine Serum "Gold" | PAA, Pasching, Österreich |
| G418-Sulphate | PAA, Pasching, Österreich |
| Hygromycin B | PAA, Pasching, Österreich |
| Lipofectamine™ 2000 Reagent | Invitrogen, Karlsruhe |
| Lithiumchlorid | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Opti-MEM® I reduced serum Medium (1x) | Invitrogen, Karlsruhe |
| Penicillin/Streptomycin | PAA, Pasching, Österreich |
| Polyethylenimine (25 000 kDa, linear) | Polysciences Inc. Europe, Eppelheim |
| Natriumchlorid | Carl Roth, Karlsruhe |
| Trypsin EDTA | PAA, Pasching, Österreich |
| Zellkulturschalen | BD Bioscience, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg |

D.1.2.4 Chemikalien und Materialien für proteinchemische Techniken

Tabelle D.4

| Chemikalie | Hersteller |
|--|---|
| 2-Mercaptoethanol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Acryl/Bisacryl Mix 29:1 (30%) | Biorad, München |
| Ammoniumpersulfat | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Benzonase® Nuclease | Novagen, Merck, Karlsruhe |
| Bromophenol Blau Natriumsalz | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| CL-X Posure Film | Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford USA |
| DEPC (DNase, RNase freies) Wasser | Invitrogen, Karlsruhe |
| DTT | Sigma, München |
| EDTA | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Entwicklungsreagenz SuperSignal Elisa Femto SuperSignal West Pico SuperSignal West Dura | Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford USA |
| Essigsäureanhydrid | Carl Roth, Karlsruhe |

| | |
|--|------------------------------|
| Glycin | Carl Roth, Karlsruhe |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat | Carl Roth, Karlsruhe |
| Methanol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Milchpulver | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumchlorid | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Precision Plus Protein™ Standards All Blue | Biorad, München |
| Proteaseinhibitor Cocktail Set | Calbiochem, Merck, Karlsruhe |
| Quick Start Bradford Protein Assay | Biorad, München |
| Salzsäure (HCL) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| TEMED | Carl Roth, Karlsruhe |
| Trisma Base | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Tween® | Carl Roth, Karlsruhe |

Tabelle D.5 Rezepte für Puffer und Gele

| | |
|--|--|
| 5% Sammelgel: <ul style="list-style-type: none"> • 3,4mL gefiltertes Wasser • 830µL 30% Acryl/Bisacrylamid Mix 29:1 • 630µL 1,5M Trisma Base pH 6,8 • 50µL SDS 10% • 50µL Ammoniumpersulfat • 5µL TEMED | 1xTransferpuffer: <ul style="list-style-type: none"> • 80ml 1M Trisma Base pH 8,0 • 13,3 ml 3M Natriumacetat pH 8,0 • 8ml 0,5M EDTA pH 7,4 • 10ml 10% SDS • 400,0ml 20% v/v Methanol • ad 2000mL gefiltertes Wasser |
| 10xSDS PAGE Laufpuffer: <ul style="list-style-type: none"> • 30g 0,25M Trisma Base • 144,1g 1,92M Glycin • 30g 1% SDS • ad 1000mL gefiltertes Wasser | Blocking Lösung: 2% bzw 5% Trockenmilchpulver in 1xTBS-T 2xLämmli-Puffer: <ul style="list-style-type: none"> • 125 mM Tris pH 6,8 • 4% SDS • Bromophenol Blau • 20% DTT |
| 10% Trenngel: <ul style="list-style-type: none"> • 5,9mL gefiltertes Wasser • 5,0mL 30% Acryl/Bisacrylamid Mix 29:1 • 3,8mL 1,5M Trisma pH 8,8 • 150µL SDS 10% • 150µL Ammoniumpersulfat • 6µL TEMED | 25xTBS Stammlösung: <ul style="list-style-type: none"> • 60g Trisma Base • 200g Natriumchlorid • 7,9mL 12N Salzsäure • ad 1000mL gefiltertes Wasser 1xTBS-T: <ul style="list-style-type: none"> • 1x TBS • 0,2% Tween |

D.2 Methoden

D.2.1 Molekularbiologische Methoden

D.2.1.1 Isolierung von DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurden das NucleoSpin Plasmid QuickPure Kit (Macherey-Nagel) sowie das HiYield® Plasmid Mini Kit (SLG Süd-Laborbedarf) nach den jeweiligen Herstellerprotokollen eingesetzt.

Grundlage für die DNA-Isolierung aus Bakterien ist die modifizierte Methode der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) (Vogelstein and Gillespie, 1979).

Zunächst wurden die Bakterien vom Wachstumsmedium abzentrifugiert. Anschließend erfolgte durch Zugabe verschiedener Lösungen die Resuspension und alkalische Lyse der Zellen. Proteine und genomische DNA wurden ausgefällt, die Lyselösung neutralisiert und auf mit Silikamembranen beschichtete DNA-Säulen überführt. An die Abzentrifugation der ausgefällten Proteine und der genomischen DNA schlossen sich mehrere Waschschriffe mit verschiedenen Puffern an, die jeweils durch einen Zentrifugationsschritt beendet wurden. Zum Abschluss wurde die DNA in Aqua. dest. eluiert.

D.2.1.2 Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen

Zur RNA-Gewinnung aus Zellen wurde TriFast™ Reagent® (PeqLab, Erlangen) nach den Angaben des Herstellers verwendet, basierend auf der Guanidiniumisothiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski (Chomczynski and Sacchi, 1987). Nach der Lyse der Zellen und Inaktivierung von RNasen durch TriFast™ Reagent® erfolgte die Phasentrennung durch Zugabe von Chloroform. Im Anschluß wurde die wässrige Phase abgenommen, um die darin enthaltene RNA mittels Isopropanol zu präzipitieren. Das so gewonnene Pellet wurde nach Abnehmen des Überstandes in einem zusätzlichen Waschschriffe mit 1mL eiskaltem Ethanol 75% von Isopropanolresten und Salzen gereinigt. Zuletzt wurde die RNA in RNase-freiem Wasser gelöst und ihre Konzentration photometrisch bestimmt. Verwendet wurde die RNA zur cDNA-Synthese anhand der Reverse Transkriptions-PCR.

Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentrationen der DNA- und RNA-Lösungen wurden im Photometer durch die Absorptionsbestimmung bei 260 nm und 320nm in einer Quarzküvette ermittelt. Für die Berechnung der Konzentration von Nukleinsäuren kam folgende Formel zur Anwendung:

$$[c]_{\text{Nukleinsäure}} = \text{Absorptionskoeffizient} \times A_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung} \times \mu\text{g/ml}$$

Der Absorptionskoeffizient bei einer Weglänge von 1 cm beträgt 50 für dsDNA und 40 für RNA. Protein-Verunreinigungen wurden durch den Quotienten $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ erfasst. Ein Verhältnis von $> 1,8$ sprach für proteinfreie Nukleinsäurelösungen.

D.2.1.3 Isolierung von RNA aus Kolonkarzinom-Biopsaten

Für die Isolierung von RNA aus Kolonkarzinom-Biopsaten erfolgte eine Standard FFPE-Verarbeitung. Dafür wurden die Gewebeproben in Formalin fixiert, um anschließend in Paraffin eingebettet zu werden. Aus den Paraffin-Blöcken wurden mit einem Mikrotom 8µm dicke Gewebeschnitte erstellt und auf einen Objektträger überführt. Mit einem Skalpell wurde Tumorgewebe beziehungsweise gesundes Darmgewebe derselben Patienten als Kontrolle von dem Objektträger heruntergekratzt, um daraus mittels TriFast™ Reagent® die RNA aus dem mikrodissoziierten Gewebe zu gewinnen. Als Referenz für die Identifizierung der Tumoreale wurde ein Parallelschnitt mit Hematoxylin und Eosin gefärbt. Die RNA wurde für die Verwendung in der quantitativen Real-Time-PCR durch eine Reverse Transkriptions-PCR in cDNA umgeschrieben.

D.2.1.4 cDNA-Synthese (RT-PCR)

Die für den Einsatz in der quantitativen RT-PCR benötigte complementary DNA (cDNA) wurde mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und des SuperScript™ First Strand Synthesis System Kits (Invitrogen) aus der isolierten Total-RNA synthetisiert. Um in dem ersten Schritt DNA zu verdauen, welche in späteren Reaktionen potenziell störend wirken könnte, wurde die Lösung mit DNase I (Invitrogen) inkubiert. Darauf folgte das Umschreiben der RNA in einzelsträngige cDNA durch eine retrovirale reverse

Transkriptase und dem Einsatz von Zufalls-Primern. Abschließend wurden verbliebene RNA-Reste durch RNase H verdaut. Um bei möglichst geringem Materialeinsatz eine möglichst hohe cDNA Ausbeute zu erzielen, wurden die im Herstellermanual angegebenen Mengen und Konzentrationen modifiziert. Die genauen Mengenangaben und Arbeitsschritte sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Zur Kontrolle der cDNA-Synthese wurde eine konventionelle PCR mit GAPDH-Primern durchgeführt und die PCR-Produkte mittels Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

Tabelle D.7

| Schritt | Menge (Konz.) | Reagenz | Inkubation |
|--------------------------------|--|---|--|
| DNA Verdau | 8µL (0,5µg/µL) 1µL 1µL | RNA 10xDNase Puffer DNase I | 25°C, 15min 4°C, 1min |
| Denaturierung | 1µL (25mM) | EDTA | 65°C, 15min 4°C, 1min |
| Hybridisierung | 1,375µL 1,375µL (10mM) | Random Hexamer Primer dNTPs | 65°C, 5min 4°C, 1min |
| reverse Transkription (Teil 1) | 2,75µL 5,5µL (25mM) 2,75µL (0,1M) 1.375µL | 10xRT-Puffer MgCl ₂ DTT RNaseOUT™ | 25°C, 2min |
| reverse Transkription (Teil 2) | 1,375µL | Super-Script™ II | 25°C, 10min 42°C, 50min 70°C, 15min 4°C, 1min |
| RNA Verdau | 1,375µL | RNase-H | 37°C, 20min 4°C, 1min |

D.2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

D.2.1.5.1 Allgemeines Prinzip und Standardbedingungen

Die PCR wird eingesetzt, um aus einem Gemisch von Nukleinsäuren spezifische DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Als Matrize mit dem zu vervielfältigenden Abschnitt (Template) dient DNA in Form von cDNA, genomischer DNA und Plasmid-DNA. Durch Oligonukleotid-Primerpaare mit spezifischer Basensequenz wird auf beiden DNA-Einzelsträngen spezifisch ein Abschnitt für die Amplifikation definiert.

Durch den Einsatz von thermostabilen DNA-Polymerasen läuft die Amplifikation automatisiert in aufeinanderfolgenden Zyklen ab. Ein solcher Zyklus umfasst drei Schritte:

- Denaturierung: Trennung der Doppelstränge der Template-DNA
- Primerhybridisierung: Bindung der Primer an komplementäre Sequenzen auf den Einzelsträngen der Template-DNA
- Elongation: Synthese eines neuen DNA-Doppelstrangs durch Auffüllen des fehlenden Stranges mit Oligonukleotiden, von den Primern ausgehend

Soweit es nicht anders angegeben wird richteten sich alle Reaktionsbedingungen nach den Herstellerangaben der jeweiligen Polymerasen. Für die Denaturierung wurden Temperaturen von 95-98°C (30 sec) gewählt. Es wurden die mitgelieferten Reaktionspuffer benutzt, um Salzkonzentration und pH-Wert einzustellen. Gegebenenfalls wurde Magnesiumchlorid zu einer Endkonzentration von 1,25 mM zugesetzt. Die Konzentration der Oligonukleotid-Primer betrug 0,5 µM je Primer und die der Nukleotid-Monomere 0,8 mM (0,2 mM pro Nukleotid). Die Hybridisierungstemperatur wurde mindestens 1°C über dem jeweils höheren der für die Oligonukleotide berechneten Werte gewählt und betrug standardmäßig 55°C. Reagenzien wie Betain, DMSO oder Quinocinon, die die Hybridisierungstemperatur beeinflussen, wurden nicht eingesetzt. Die Elongationstemperatur betrug bei den eingesetzten Polymerasen 72°C. Für die Elongationszeit wurden je nach Herstellerangaben 1 000nt min⁻¹ (Nukleotide pro Minute) oder 500nt min⁻¹ zu Grunde gelegt. Als PCR-Maschinen dienten der PTC-200 Thermo Cycler (MJ Research, Watham, USA) und der Corbett Rotorgene RG-3000 (Quiagen, Hilden).

Alle Primersequenzen, mit Ausnahme der Mutationsprimersequenzen, wurden mithilfe des Primer3-Programms (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) generiert (Rozen and Skaletsky, 2000) und von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen.

D.2.1.5.2 Konventionelle PCR

Die konventionelle PCR diente zum einen der Qualitätskontrolle von cDNA nach reverser Transkription sowie zum Nachweis definierter DNA-Abschnitte im Rahmen von Klonierungen. Für den Test der cDNA wurden die HotStarTaq® DNA Polymerase (Quiagen, Hilden) und GAPDH-Primer verwendet. Um im Rahmen von Klonierungen solche transformierten Bakterienkolonien zu identifizieren, die Plasmid-DNA mit entsprechendem Insert beinhalten, wurde die Paq5000™ DNA Polymerase (Agilent) eingesetzt. Dafür wurden

die Bakterien als Template direkt mit der Pipettenspitze von der Agar-Platte in die Reaktionslösung übertragen.

Die Produkte wurden nach der PCR in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und bezüglich ihrer Länge beurteilt.

Tabelle D.8

| Reagenz | Eingesetztes Volumen |
|---------------------|----------------------|
| 10x Paq Puffer | 2µL |
| dNTP Mix (10mM) | 0,5µL |
| Primer FW (10µM) | 1µL |
| Primer RV (10µM) | 1µL |
| Paq5000™ Polymerase | 0,5µL |
| H ₂ O | 15µL |

Tabelle D.6

| Schritt | Temperatur | Dauer | Zyklenzahl |
|-------------------|------------|----------|------------|
| Enzymaktivierung | 95°C | 3min | 35 Zyklen |
| Denaturierung | 95°C | 20sek | |
| Hybridisierung | 50°C | 20sek | |
| Elongation | 72°C | 30sek/kb | |
| Finale Elongation | 72°C | 5min | |

D.2.1.5.3 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR wurde angewandt, um quantitative Aussagen über mRNA-Transkripte zu treffen. Basierend auf der Quantifizierung mittels interkalierender Farbstoffe kam dafür SYBR® Green I (Invitrogen, Karlsruhe) zum Einsatz. Dieses wurde dem Reaktionsansatz aus einer 10.000-fach konzentrierten Stammlösung zugesetzt. Die als Template eingesetzte cDNA-Menge entsprach in der Regel 0,20 bis 0,25 µg Gesamt-RNA. Lagen die Zielsequenzen in sehr geringen Konzentrationen vor, wurden im Einzelfall auch Äquivalentmengen bis 1,0 µg RNA verwendet.

Die erhobenen Ct-Werte wurden auf GAPDH normiert, um Schwankungen in der Templatemenge auszugleichen. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Winer et al., 1999; Livak and Schmittgen, 2001). Alle qRT-PCR Daten wurden auf einem Corbett Rotorgene RG-3000 (Qiagen, Hilden) erhoben. Der eingesetzte Puffer, Q-Solution sowie MgCl₂ stammten ebenso wie die HotStar Taq® Polymerase von Qiagen. Die als Primer verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle D.12 aufgelistet.

Tabelle D.10

| Reagenz | Eingesetztes Volumen |
|--------------------------|----------------------|
| 10x Puffer | 2 µl |
| 5x Q-Solution | 4 µl |
| MgCl ₂ (25mM) | 0,8 µl |
| dNTP Mix (10mM) | 0,5 µl |
| Primer FW (10µM) | 1 µl |
| Primer RV (10µM) | 1 µl |
| SYBR® Green I | 0,8 µl |
| HotStar Taq® | 0,2 µl |
| Template | 8 µl |
| H ₂ O | 1,7 µl |

Tabelle D.7

| Schritt | Temperatur | Dauer | Zyklenzahl |
|------------------|------------|-------|------------|
| Enzymaktivierung | 95°C | 15min | 40 Zyklen |
| Denaturierung | 95°C | 30sek | |
| Hybridisierung | 58-60°C | 1min | |
| Elongation | 72°C | 30sek | |
| Messpunkt | 82°C | 20sek | |

Tabelle D.8

| Gen | Forward-Primer Reverse-Primer |
|---------------------------------------|---|
| CTNNB1 | 5'-CCGCAAATCATGCACCTTT- 3' 5'-TGATGTGCACGAACAAGCAA- 3' |
| GAPDH | 5'-CCACCCAGAAGACTGTGGAT- 3' 5'-TTCAGCTCAGGGATGACCTT- 3' |
| TNFRSF19 (Isoform unspezifisch) | 5'-CTATGGGGAGGATGCACAGT- 3' 5'-TCTCCACAAGGCACACACTC- 3' |
| TNFRSF19 (Isoform unspezifisch) | 5'-GGCTGTTCCAGTCCAGTCTC- 3' 5'-TGGATGACAGCACCACTCTC- 3' |
| TNFRSF19.1 | 5'-GGCTGTTCCAGTCCAGTCTC- 3' 5'-GAACCCAGTCGCTGCCTTA- 3' |
| TNFRSF19.2 | 5'-GGCTGTTCCAGTCCAGTCTC- 3' 5'-TCTACTGCAGAAAGAAGCAGGTT- 3' |

D.2.1.5.4 PCR für Klonierungen

Um die gewünschten DNA-Abschnitte für Klonierungen zu amplifizieren wurde die Phusion® HotStart DNA Polymerase (Finnzymes, Schwerte) verwendet. Als Template für die Expressions-konstrukte pcDNA3_TNFRSF19.1-HA und pcDNA3_TNFRSF19.2-HA sowie für die Promoterkonstrukte pGL3-Basic_1A und pGL3-Basic_1B wurde genomische DNA der Zelllinie LoVo verwendet. Für die weiteren Promoterkonstrukte diente Plasmid-DNA als Template. Die genomische DNA wurde nach den Herstellerangaben mithilfe des Nucleo Spin C+T Kits (Machery-Nagel, Düren) gewonnen.

Das Expressionskonstrukt für die dominant-negative Mutante von TNFRSF19, bezeichnet als pcDNA3_dnTNFRSF19-HA, wurde von PD Dr. Andreas Herbst (Arbeitsgruppe Molekulare Gastroenterologie, Klinikum Großhadern) generiert. Als Template für die PCR verwendete er Plasmid-DNA von pcDNA3_TNFRSF19.1-HA.

Tabelle D.15 listet sämtliche verwendeten Primer auf.

Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mithilfe des NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt und in Aqua. dest. eluiert.

Tabelle D.9

| Reagenz | Eingesetztes Volumen |
|------------------------------|----------------------|
| 5x HF Puffer | 4 µl |
| dNTP Mix (10mM) | 0,4 µl |
| Primer FW (10µM) | 1 µl |
| Primer RV (10µM) | 1 µl |
| Phusion® HotStart Polymerase | 0,2 µl |
| Template | 0,5 µl |
| H ₂ O | 12,9 µl |

Tabelle D.10

| Schritt | Temperatur | Dauer | Zyklenzahl |
|-------------------|------------|----------|------------|
| Enzymaktivierung | 98°C | 30sek | 40 Zyklen |
| Denaturierung | 98°C | 15sek | |
| Hybridisierung | 55°C | 15sek | |
| Elongation | 72°C | 30sek/kb | |
| Finale Elongation | 72°C | 5min | |

Tabelle D.11 Primer für Expressions- und Promoterkonstrukte

| Konstrukt | Forward-Primer Reverse-Primer |
|----------------------|--|
| pcDNA3_TNFRSF19.1-HA | 5'-GCGATATCATGGCTTTAAAAGTG CTACTAGAACAAG- 3' 5'-ATGCGGCCGCCTACGCATAGTCAGGTAC ATCGTAAGGGTACAGGGAACCCAGTCGCT- 3' |
| pcDNA3_TNFRSF19.2-HA | 5'-GCGATATCATGGCTTTAAAAG TGCTACTAGAACAAG- 3' 5'-ATGCGGCCGCCTACGCATAGTCAGGTACA TCGTAAGGGTAAGCTTCCTGGAGGGACGT- 3' |
| pGL3-Basic_1A | 5'-GGCTGACGCGTCAGATGCTGTGGAGACTGGA- 3' 5'-GCGTGAAGCTTAAAGCCATCTTTCTTATCAAATGT- 3' |
| pGL3-Basic_1B | 5'-GGCTGACGCGTCCCCTGTGAGATGGGTTCTA- 3' 5'-GCGTGAAGCTTAAAGCCATCTTTCTTATCAAATGT- 3' |
| pGL3-Basic_1C | 5'-GGCTGACGCGTTGAGATATGCCAGCAGGAAA- 3' 5'-GCGTGAAGCTTAAAGCCATCTTTCTTATCAAATGT- 3' |
| pGL3-Basic_1D | 5'-GGCTGACGCGTGCCTGTGATTTCACTCGT- 3' 5'-GCGTGAAGCTTAAAGCCATCTTTCTTATCAAATGT- 3' |
| pGL3-Basic_1E | 5'-GGCTGACGCGTATCCAGCTGTGCCTCTCACT- 3' 5'-GCGTGAAGCTTAAAGCCATCTTTCTTATCAAATGT- 3' |
| pGL3-Basic_1Ea | 5'-GGCTGACGCGTATCCAGCTGTGCCTCTCACT- 3' 5'-GCGTGAAGCTTTTTTTCAGCATGCTAACTCACTT- 3' |
| pGL3-Basic_1Eb | 5'-GGCTGACGCGTGCATGCTGAAAATAGTACCTGTC- 3' 5'-GCGTGAAGCTTCAGCAGCCAATCTACTTCACTC- 3' |

| | |
|----------------------|---|
| pGL3-Basic_1Ec | 5'-GGCTGACGCGTTGAGTGAAGTAGATTGGCTGCT- 3' 5'-GCGTGAAGCTTTGAGAATTGAAGCTCTGTTTACC- 3' |
| pGL3-Basic_1Ed | 5'-GGCTGACGCGTGGTAAACAGAGCTTCAATTCTCA- 3' 5'-GCGTGAAGCTTAACATCAGTGACTGTGCTTTGT- 3' |
| pGL3-Basic_1Ee | 5'-GGCTGACGCGTAGCACAGTCACTGATGTTTTTA- 3' 5'-GCGTGAAGCTTAAAGCCATCTTTCTTATC- 3' |
| pcDNA3-dnTNFRSF19-HA | 5'- AGCTCGGTACCACCATGGCTTTAAAAGTGCTA- 3' 5'- GCATGGCTAGCATAGATGACACAGAGGAT- 3' |

D.2.1.5.5 Site-directed mutagenesis

Mittels Klonierungs-PCR sowie unter Verwendung des QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) wurden Bindungssequenzen in Promotorfragmenten spezifisch verändert. Die dafür eingesetzten Mutationsprimer wurden mithilfe des *Quick Change Primer Design* Programms (siehe Agilent-Website <http://www.genomics.agilent.com>) so gewählt, dass sie komplementär zu jeweils einem der Doppelstränge des Template-Plasmids sind und die veränderte Basensequenz enthalten (siehe Tab. D.18). Die Reaktionsbedingungen entsprachen den Vorgaben des Herstellers. Für die Mutagenese mittels Klonierungs-PCR wurden *Mismatchprimer* benutzt, welche die veränderte Nukleotidsequenz enthielten. Die Reaktionsbedingungen für die Mutagenese per Klonierungs-PCR entsprachen den Angaben in Tab. D.17. Die als Primer verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen und sind in der Tabelle D.19 aufgelistet.

Tabelle D.12

| Reagenz | Eingesetztes Volumen |
|---------------------------|----------------------|
| 10x Puffer | 5µL |
| dNTP Mix (10mM) | 1µL |
| Forward-Primer (125ng/µL) | 1µL |
| Reverse-Primer (125ng/µL) | 1µL |
| Pfu Ultra Polymerase | 1µL |
| Template (10ng/µL) | 5µL |
| H ₂ O | 36µL |

Tabelle D.13

| Schritt | Temperatur | Dauer | Zyklenzahl |
|-------------------|------------|-------|------------|
| Enzymaktivierung | 95°C | 30sek | 18 Zyklen |
| Denaturierung | 95°C | 30sek | |
| Hybridisierung | 50°C | 1min | |
| Elongation | 68°C | 6min | |
| Finale Elongation | 68°C | 10min | |

Tabelle D.14 Primer für site-directed mutagenesis mittels (QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit)

| Konstrukt und mutierte TCF-Bindestelle | Mutagenese-Primer |
|--|--|
| pGL3-Basic_1E_mut Bindestelle #12 (sense-Primer) | 5'-CTAGTCTATATAGTAAGTGGTAGATATTATATAG TAACTAAAGCACAGTCACTGATGTT- 3' |
| pGL3-Basic_1E_mut Bindestelle #12 (antisense-Primer) | 5'-AACATCAGTGACTGTGCTTTAGTTACTATATA ATATCTACCACTTACTATATAGACTAG- 3' |

Tabelle D.15 *Missmatchprimer* für Mutagenese mittels PCR

| Konstrukt | Forward-Primer Reverse-Primer |
|--------------------------------------|--|
| pGL3-Basic_1E_mut Bindestelle #13 | 5'-GGCTGACGCGTAGCACAGTC ACTGATGTTTTTA- 3' 5'- GCGTGAAGCTTAAAGCCATCTTTA GTATCAAATGTATT - 3' |
| pGL3-Basic_1Ee_del | 5'-GGCTGACGCGTAGCACAGTC ACTGATGTTTTTA- 3' 5'-GCGTGAAGCTTAAAGCCTAATCAAAT GTATTTATTGTTGGAGAGTTC- 3' |
| pGL3-Basic_1Ee_mut1 | 5'-GGCTGACGCGTAGCACAGTC ACTGATGTTTTTA- 3' 5'-GCGTGAAGCTTAAAGCCTAGCAGTGCTCAAAT GTATTTATTG- 3' |

| | |
|---------------------|---|
| pGL3-Basic_1Ee_mut2 | 5'-GGCTGACGCGTAGCACAGT CACTGATGTTTTTA- 3' 5'-GCGTGAAGCTTAAAGCCATAGGGAT TATCAAATGTATT- 3' |
|---------------------|---|

D.2.1.5.6 Agarose-Gelelektrophorese

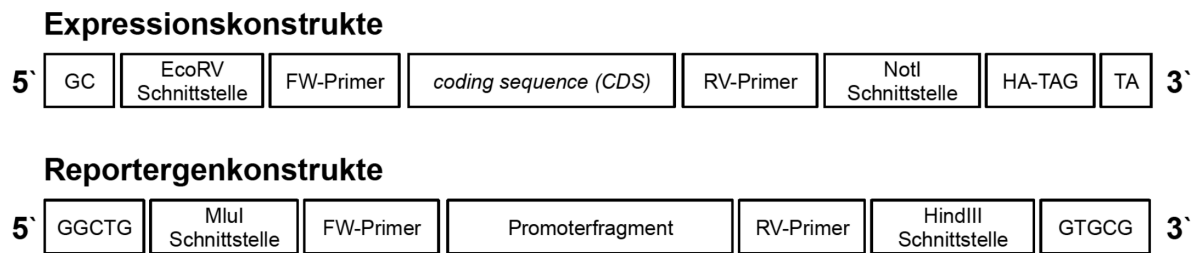
DNA-Fragmente wurden ihrer Länge nach in 1%-igen Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Dafür wurde Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) in TAE Puffer aufgekocht, mit 0,1–0,5µg/ml Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Steinheim) versehen und zum Abkühlen in einen Gelschlitten (Biorad, München) gegossen. Zum Laden von DNA-Proben wurden diese mit 6x Orange Loading DNA Ladepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt. Die Elektrophorese wurde bei 120V für 20min durchgeführt. Mit einem UV-Transluminator (UVP Ltd., Cambridge) wurden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht und fotografiert. Als Größenstandard wurde die O'Gene Ruler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas) verwendet. Im Rahmen von Klonierungen wurden DNA-Fragmente der erwarteten Größe nach der Elektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und mithilfe des NucleoSpin® Extract II Gelextraktionskit (Machery-Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

D.2.1.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

D.2.1.6.1 Vektoren und Einsätze

Klonierungen wurden verwendet, um konstitutiv aktive Expressionskonstrukte und Reportergenkonstrukte zu generieren. Dafür wurden mittels PCR spezifische Genabschnitte unter Verwendung spezifischer Oligonukleotid-Primer wie unter D.2.1.5.4 beschrieben synthetisiert. Das Prinzip des Designs der Klonierungsprimer wird in Abbildung D.1 veranschaulicht. Um den Einbau in den gewünschten Vektor zu ermöglichen waren die jeweiligen Primer an ihren 5'-Enden mit Restriktionsschnittstellen versehen.

Abbildung D.1



Als Vektoren wurden der pcDNA3-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) für die konstitutiv aktiven Expressionskonstrukte und der pGL3-Basic-Vektor (Promega, Mannheim) für die Reportergenkonstrukte verwendet. An das 3'-Ende der kodierenden Sequenz (*coding sequence*, CDS) wurde bei den Expressionskonstrukten zusätzlich ein HA-Tag (Proteinsequenz: YPYDVPDYA) angehängt. Dieser diente der besseren Detektion der exprimierten Proteine im Western Blot.

Von PD Dr. Andreas Herbst (Arbeitsgruppe Molekulare Gastroenterologie, Leitung Univ.-Prof. Dr. med. Kolligs, Klinikum Großhadern) wurde das Plasmid für die dominant-negative TNFRSF19 Mutante zur Verfügung gestellt, bei welcher die extrazelluläre Domäne vollständig fehlt. Hierfür verwendete er als Ausgangskonstrukt das Plasmid pcDNA3_ITF2A-HA (beschrieben in Herbst et al., 2009) als Vektor. Sowohl dieser Vektor wie auch die PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen KpnI (Fermentas) und NheI (New England Biolabs, Frankfurt) verdaut. Damit erhielt das neue Konstrukt neben der intrazellulären Domäne von TNFRSF19 auch den HA-Tag des Plasmides pcDNA3_ITF2A-HA.

Alle Konstrukte wurden per DNA-Sequenzierung auf Mutationen untersucht.

D.2.1.6.2 Enzymatischer Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Für die Inkubation von aufgereinigten PCR-Amplifikaten und Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen (Fermentas, St. Leon-Rot sowie New England Biolabs, Frankfurt) wurden 0,1 bis 8 mg DNA und 1 µl der Enzymlösung in den mitgelieferten Pufferlösungen eingesetzt. Die Dauer betrug mindestens 4 Stunden bis maximal über Nacht bei 37°C. Soweit möglich und experimentell sinnvoll wurden die Restriktionsendonukleasen nach Reaktionsende durch Erhitzen auf 65°C oder 80°C für 15 min inaktiviert. Doppelverdaue wurden in kompatiblen Puffern des Herstellers durchgeführt. Im Anschluss wurden die Nukleinsäuren erneut elektrophoretisch aufgetrennt und aufgereinigt.

Für die Klonierung sämtlicher Reportgenkonstrukte wurden die Restriktionsenzyme MluI und HindIII verwendet, für die der Expressionkonstrukte pcDNA3_TNFRSF19.1-HA und pcDNA3_TNFRSF19.2-HA die Enzyme EcoRV und NotI sowie KpnI/NheI für die Klonierung des dominant-negativen TNFRSF19-Konstrukt.

D.2.1.6.3 Ligation

Für Ligationen wurden die zuvor mit Restriktionsenzymen verdauten PCR-Amplifikate und die entsprechende Vektor-DNA in T4-Puffer (Fermentas) für 45-60 min bei Raumtemperatur mit 0,5µl der Ligaselösung inkubiert. Die T4-DNA-Ligase verfügt auch nach Reaktionsende über eine hohe Bindungsaffinität an Ihr Substrat. Daher wurde im Anschluß an die Ligation eine Hitzeinaktivierung für 10 min bei 65°C durchgeführt. Es folgte die Transformation kompetenter DH5α-E.coli Bakterien mit dem Vektor-Insert-Konstrukt und zuletzt die Selektion unter Zuhilfenahme der auf dem Vektor kodierten Antibiotikaresistenzen.

D.2.1.7 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden beim Labor für Funktionale Genanalysen LAFUGA des Genzentrums der LMU München durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzhistogramme erfolgte in der Software Chromas Lite. Für Sequenzvergleiche wurden der Onlineservice BLAST des NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) oder die Software Serial Cloner genutzt. Die Primer für Sequenzierungen wurden von der Firma Metabion bezogen und sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle D.0

| Vektor-Rückgrat des sequenzierten Konstruktes | Forward-Primer Reverse-Primer |
|---|---|
| pcDNA3 | 5'-TAATACGACTCACTATAGGG- 3` 5'-CATTTAGGTGACACTATAG- 3` |

| | |
|------------|---|
| pGL3-Basic | 5'-CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA- 3' 5'-CTAGCAAAATAGGCTGTCCC- 3' |
|------------|---|

D.2.1.8 Reporteragen Assay

Um die Transaktivierung von Promotorregionen durch Transkriptionsfaktoren zu analysieren werden Reportergene verwendet, deren Expressionsprodukte leicht quantifiziert werden können. Auf den von uns verwendeten Reporteragenplasmiden pGL3-Basic (Promega) und p106 steht das Gen für Leuchtkäferluziferase (*Firefly Luciferase*) unter der Kontrolle von einem zu untersuchenden Promotor. Die Aktivierung dieser Promotoren führt zu einer verstärkten Luziferaseexpression, welche im Reporteragen Assay gemessen wurde.

Zur Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurden die Zellen nach einem Waschschrift in Reporter-Lyse Puffer (Promega) lysiert. Nach einem Einfrier-Auftau-Schritt bei minus 80°C und Raumtemperatur wurden die Zelllysate bei 4°C abzentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wurde in einer LUMITRAC 600 Microplate (Greiner Bio One, Frickenhausen) mit Luziferin aus dem Luciferase Assay System (Promega) versetzt und anschließend die Lumineszenz im Orion II Microplate Luminometer (Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim) gemessen. Um den Einfluss von Schwankungen in der Transfektionseffizienz, der Zellzahl, sowie von Pipettierfehlern auf das Ergebnis zu reduzieren, wurde zusätzlich zu den Promoterkonstrukten und Aktivatoren das Kontrollplasmid pcH110 (Amersham, München) kotransfiziert, welches das β -Galaktosidase-Gen unter der Kontrolle des frühen SV40 Promotor/Enhancer beinhaltet. Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde bestimmt, indem Überstand in einer ELISA Microplate (Greiner Bio One) mit β -Galaktosidase Puffer für maximal 8h bei 37°C inkubiert und der Farbumschlag photometrisch bei 405nm auf dem Easy Reader SF Plus (SLT Labinstrumente/Tecan Group Ltd., Männergdorf) quantifiziert wurde. Für die Auswertung der Versuche wurden die erhobenen Luziferase-Werte einer Probe durch den jeweiligen Wert der β -Galaktosidase-Aktivität geteilt.

Promotorcharakterisierung

Die funktionelle Bedeutung von Promoterfragmenten für die Regulation der Genexpression sowie die Interaktionen von Transkriptionsfaktoren wurden im Reporteragen Assay untersucht. Dafür wurden Promoterfragmente des TNFRSF19.1 Gens in die *multiple cloning site* (MCS) des Luziferasevektors pGL3-Basic (Promega) kloniert. Diese Konstrukte wurden

kotransfiziert mit Expressionsvektoren für konstitutiv aktives β -Catenin (pcDNA3_S33Y, AG Kolligs) und *full length* TCF4 (pcDNA3_TCF4, AG Kolligs) (beschrieben in Kolligs et al., 2000) als Aktivatoren sowie pcDNA3-Leervektor als Kontrolle. Der pTOPflash-Reporter diente als *Proof of Principle*-Kontrolle der β -Catenin/TCF4-abhängigen Aktivierung. Er wurde uns freundlicherweise von Randall T. Moon (University of Washington, USA) überlassen und enthält drei optimierte TCF-Bindestellen *upstream* eines minimalen Promoters sowie eine *Firefly Luciferase*-kodierende Sequenz.

NF- κ B Assay

Die Aktivität des NF- κ B-Signalweges wurde mithilfe des Reporterplasmids p106 (Arenzana-Seisdedos et al., 1993) bestimmt, welches freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Rust (Klinikum Großhadern) bereitgestellt wurde (Rust et al., 2006). p106 ist ein Derivat des conalbumin-CAT-Vektors und enthält ein Luziferasegen unter der Kontrolle von drei synthetischen κ B-Konsensusmotiven (Sequenz: 5'-GGGACTTTCC-3') des Immunglobulin-K Promoters. Eine Aktivierung des NF- κ B-Signalweges führt zu einer verstärkten Expression des Luziferasegens. Die Messung der Lumineszenz sowie die Normierung mithilfe der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte im oben beschriebenen Reporter-Gen Assay.

D.2.2 Mikrobiologische Methoden

D.2.2.1 Transformation kompetenter *Escherichia Coli* Bakterien

Für Transformationen von Plasmid-DNA wurden standardmäßig DH5 α -*E.coli* Bakterien (Invitrogen) verwendet. Als einzige Abweichung davon wurden XL1-Blue supercompetent *E.coli* Bakterien (Stratagene) mit den Konstrukten transformiert, deren Sequenz mithilfe des QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) verändert worden war. Das Protokoll der Transformationen war für beide *E.coli* Stämme nahezu identisch. 50 μ l der auf Eis aufgetauten Bakteriensuspension wurden durch vorsichtiges Rühren mit der Pipettenspitze mit 1-10 ng Plasmid-DNA bzw. maximal 5 μ l Ligationsansatz vermischt und so für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock bei 42°C für 45 sek durchgeführt, gefolgt von weiteren 2 min auf Eis. Nach Zugabe von vorgewärmtem SOC-Medium wurden die Bakterien für 1 h bei 37°C im Schüttler bei 220 U·min⁻¹ inkubiert. Danach wurden die

Bakterien abzentrifugiert, in frischem SOC-Medium resuspendiert und auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert. Bei den XL1-Blue supercompetent *E.coli* wurde nicht abzentrifugiert, sondern direkt nach der Inkubation ausplattiert. Die Agarplatten wurden mit dem Agarkuchen zuoberst über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank bebrütet.

Gewachsene Klone wurden mittels PCR darauf getestet, ob sie das gewünschte Insert enthielten. Von Einzelkolonien, die ein Insert der erwarteten Größe enthielten, wurden Kulturen in zuvor autoklaviertem LB-Medium mit entsprechenden Selektionsantibiotikum über Nacht bei 37°C und 220 U·min⁻¹ inkubiert. Nach der Isolation der Plasmid-DNA wurde diese mithilfe von Restriktionsenzymen analysiert und schließlich mittels Sequenzierung auf unerwünschte Mutationen überprüft.

D.2.2.2 Lagerung der *E. coli* Stämme

Zur längerfristigen Lagerung der transformierten *E. coli*-Klone wurden Flüssigkulturen in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angelegt. Davon wurden 700µl mit 300µl sterilem Glycerin (Fa. Carl Roth) versetzt und bei -80°C eingefroren.

Für kürzere Lagerungen, wie z.B. zwischen verschiedenen Klonierungsschritten, wurden die *E. coli*-Bakterien lediglich auf den Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert, bebrütet und bei 4 °C aufbewahrt.

D.2.3 Zellbiologische Methoden

D.2.3.1 Zelllinien

Alle verwendeten Kolonkarzinom-Zelllinien sowie die HEK293-Zelllinie wurden von der Firma ATCC (Manassas, VA, USA) bezogen. Zur Kultivierung wurde standardmäßig DMEM-Vollmedium verwendet, welches mit 10% FBS (PAA) sowie 1% Penicillin/Streptomycin (PAA) versetzt wurde. Ausnahmen davon bildeten die Zelllinien CaCo2 (DMEM-Medium mit 20% FBS), Colo205 (RPMI-1640-Medium, 10%FBS) sowie Ht-29 (McCoy's 5A-Medium, 10%FBS). Im Begasungsbrutschrank (Thermo Fisher Scientific) betrug die Temperatur konstant 37°C in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre. Um in dem Carbonat-gepufferten Zellkulturmedium einen optimalen pH-Bereich zu erhalten, wurde 5% Kohlenstoffdioxid eingeleitet. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen in Einfrierröhrchen in einer Lösung aus

90% FBS und 10% DMSO (Sigma-Aldrich) und bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt.

D.2.3.2 Splitten konfluenter Zellen

Ab einem Bewuchs von mehr als 90% der Zellkulturschale wurden die Zellen gesplittet. Das Medium wurde abgesaugt und Überstände in einem Waschschrift mit PBS (PAA) entfernt. Anschließend wurde eine Trypsin/EDTA-Lösung (PAA) hinzugegeben und für ca. 1min bei 37°C inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Boden gelöst hatten, wurden sie mit Vollmedium resuspendiert und abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen im gewünschten Verhältnis (meist 1:10) auf 10cm Kulturschalen mit vorgewärmten Medium verteilt.

D.2.3.3 Zellzahlbestimmung

Für den Einsatz einer definierten Zellzahl in Transfektionsexperimenten ist eine genaue Bestimmung der Zellzahl notwendig. Zu diesem Zweck wurde eine Neubauer-Zählkammer (Fa. GFL, Burgwedel) verwendet wurde. Die Auszählung der Zellen erfolgte unter dem Mikroskop unter Verwendung folgender Formel:

$$\text{Zelldichte (Zellen/ml)} = (\text{Zellzahl/Zahl der Großquadrate}) \times 10^4 \times \text{ml}^{-1}$$

D.2.3.4 Transfektion von Plasmid-DNA

Für Transfektionen wurden Zellen am Tag zuvor in Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellzahl pro Kavität richtete sich nach dem jeweiligen Experiment und der Zelllinie. Als Transfektionsreagenz wurden Polyethylenimine (Abk. PEI, Fa. Polysciences Inc.) aus einer Lösung von 1g/L verwendet. Aufgrund einer besseren Transfektionseffizienz bei der Transfektion der Zelllinie DLD1 sowie bei der Transfektion von siRNA fand dafür die Lipidvesikel-basierte Methode unter Verwendung von Lipofectamin 2000 (Invitrogen) Gebrauch.

Bei den Transfektionen mit PEI wurde zunächst die Plasmid-DNA vorgelegt und mit OPTI-MEM-Medium vermischt. Parallel dazu wurde OPTI-MEM mit PEI gemischt in einem Verhältnis von 5:1 von eingesetzter Plasmid-DNA in µg zu µl der PEI-Lösung. Beide

Reaktionsansätze wurden 5min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die OPTI-MEM/PEI-Mischung zu den DNA-Lösungen zugegeben und für weitere 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde in den Zellkulturschalen der inkubierten Zellen das alte Medium entfernt und durch neues ersetzt. Für die Endozytose des DNA-PEI-Präzipitates wurden die Lösungen tropfenweise auf den Zellrasen pipettiert. Je nach Experiment wurden die Zellen 48-72h nach der Transfektion geerntet und lysiert.

Transfektionen mit Lipofectamin erfolgten nach den Anweisungen des Herstellers und einem Verhältnis von Lipofectamin 2000 zu Plasmid-DNA in µg von 2:1.

D.2.3.5 RNA-Interferenz

Zur gezielten Gen-Stillegung (Gen-Silencing) durch Einsatz von siRNA-Oligonukleotiden wurde ebenfalls Lipofectamin 2000 (Invitrogen) als Transfektionsreagenz verwendet. Dafür wurden die Zellen am Tag vor der Transfektion in antibiotikafreien DMEM-Vollmedium (10% FBS) auf einer 12-Well Zellkulturplatte ausgesät. Pro Well wurden aus einer 20µM-Lösung der siRNA-Oligonukleotide jeweils 3µl verwendet und nach den Angaben des Herstellers mit jeweils 3µl Lipofectamin 2000 und OPTI-MEM gemischt. Wurde ein Mediumwechsel aufgrund des Versuchsaufbaus nötig, so geschah dies frühestens 6h nach Transfektion. Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma Dharmacon (Thermo Fisher Scientific, Köln) bezogen. Die Katalognummern sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle D.21

| Bezeichnung der siRNA | Katalognummer |
|-----------------------|---------------|
| siβgal#1 | D-012539-01 |
| siβgal#2 | D-012539-02 |
| siβcat#1 | D-003482-01 |
| siβcat#2 | D-003482-02 |
| siβcat#3 | D-003482-03 |
| siβcat#4 | D-003482-04 |
| siTNFRSF19#1 | D-008098-02 |
| siTNFRSF19#2 | D-008098-03 |

D.2.4 Proteinchemische Methoden

D.2.4.1 Isolierung von Zytoplasmaproteinen

Zur Isolierung von Proteinen aus Zellen wurden diese zunächst mit PBS (Fa. PAA) gewaschen. Je nach Adhärenz der Zellen wurden sie anschließend in PBS abgeschabt oder mit der Pipette in PBS resuspendiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in Reporter-Lyse Puffer (Promega) aufgenommen und für die Lyse 10min auf Eis gestellt. Um das Aufschließen der Zellen zu erleichtern wurde ein Gefrier-Tau-Schritt bei -80°C und Raumtemperatur durchgeführt. Zuletzt wurde den Proben 0,5µL Benzonase (Novagen) zugegeben und 15min bei Raumtemperatur inkubiert, um noch vorhandene Nukleinsäuren zu spalten. Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden die Lysate für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt.

Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte nach einem Standardprotokoll, basierend auf der Bradford Methode (Bradford, 1976). Mit Rinderserumalbumin (Sigma-Aldrich) wurde zunächst eine Eichgerade erstellt. Dafür wurden ansteigende Mengen an Protein mit Proteinassay-Reagenz (Biorad) vermischt und ihre Absorption bei 595nm bestimmt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurden diese verdünnt und ebenso mit Proteinassay-Reagenz gemischt und photometrisch gemessen. Abschließend erfolgte dann die Berechnung der Konzentration anhand der Eichgeraden unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung.

D.2.4.2 Proteinnachweis mittels Western Blot

Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Proteintransfer

Sammel- und Trenngele für die Gelelektrophorese wurden nach den unter Tab. D.6 angegebenen Rezepten hergestellt. Die Vorbereitung der Proteinlösungen erfolgte nach der von Lämmli beschriebenen Methode (Laemmli, 1970). Die Proben wurden mit einem äquivalenten Volumen 2xLämmli-Puffer versetzt, für 5min auf 95°C erhitzt und anschließend

kurz zentrifugiert. Für die Elektrophorese wurden die Gele in eine Gelkammer (Biorad) eingespannt und diese mit Laufpuffer befüllt. Die während der Elektrophorese angelegte Spannung betrug 100V (Sammelgel) bzw. 200V (Trenngel).

Der Transfer der aufgetrennten Protein erfolgte nach der Wet-Blotting-Methode auf PVDF-Membranen (Machery-Nagel). Nach der Aktivierung der Membran in Methanol für 1min und anschließender Äquilibration in TBS-T wurde der Proteintransfer bei einer Stromstärke von 400mA für 1h ausgeführt.

Immunodetektion

Die beladenen Membranen wurden mit 5% Magermilchpulver in TBS-T geblockt. Die Primär- und Sekundärantikörper wurden mit dem in Tab. D.23 angegebenen Verdünnungsverhältnis in einer Lösung aus 1% Magermilchpulver gelöst in TBS-T vorbereitet und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Zur Immundetektion der Sekundärantikörper wurden je nach erwarteter Signalintensität die Substrate SuperSignal West Pico, SuperSignal West Dura und SuperSignal Elisa Femto (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc.) eingesetzt. Die Expositionsdauer der Filme betrug wenige Sekunden bis 5min. Mit einer Agfa Curix 60 Entwicklermaschine (Agfa Healthcare GmbH) erfolgte die Entwicklung der Filme auf CL-X Posure Film (Thermo Fisher Scientific Inc.)

Tabelle D.22

| Bezeichnung | Verdünnung | Hersteller |
|--------------------------------------|-------------------|---|
| Primärantikörper | | |
| Anti-HA High Affinity Antibody | 1:2.500 | Roche, Mannheim |
| Monoclonal Mouse Anti-Actin | 1:2.500 | MP Biomedicals, Eschwege |
| Sekundärantikörper | | |
| Mouse IgG, HRP-linked whole Antibody | 1:10.000 | GE Healthcare, München |
| Goat-anti-rat-IgG-HRP | 1:10.000 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg |

E Ergebnisse

E.1 Identifizierung von Wnt/ β -Catenin-Zielgenen

E.1.1 DNA Microarray

Zur Identifizierung von Zielgenen des Wnt-Signalweges in kolorektalen Karzinomzelllinien wurde von unserem Labor in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Helmut Blum (Labor für Funktionelle Genom Analyse, Genzentrum der Universität München) ein DNA Mikroarray-Experiment durchgeführt. Dafür wurden die Zelllinien DLD1 und SW480 mit β -Catenin siRNA behandelt. Abb. E.1 zeigt den erfolgreichen *Knockdown* von β -Catenin Protein im Western Blot. Für alle weiteren in dieser Dissertation gezeigten Versuche wurde, falls nicht anders angegeben, die β -Catenin siRNA si β cat#4 und die β -Galaktosidase siRNA si β gal#2 eingesetzt. Aus den mit siRNA behandelten Zellen wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und für die Hybridisierung im DNA Mikroarray-Experiment (Human Genome U133 Plus 2.0, Affymetrix) verwendet. Dabei entdeckten wir, dass TNFRSF19 durch β -Catenin reguliert wird. Aufgrund dieser Regulation durch β -Catenin und seiner Zugehörigkeit zur TNF-Rezeptor-Superfamilie wurde der Rezeptor TNFRSF19 zur weiteren Charakterisierung ausgewählt.

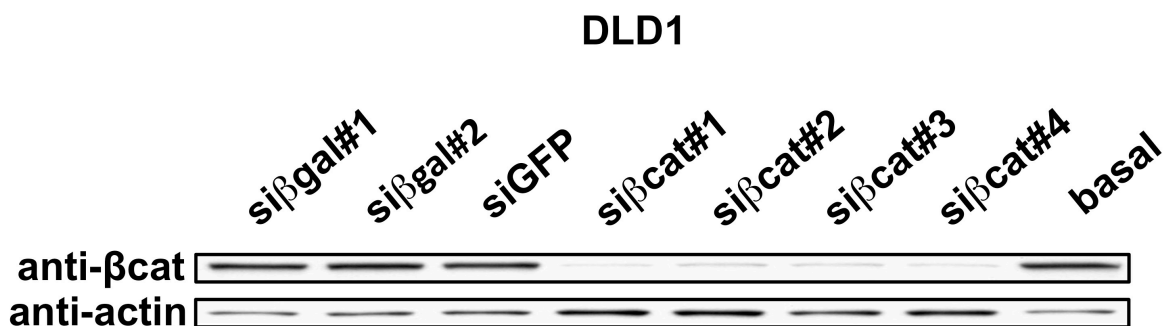


Abb. E.1 Erfolgreiche Herabregulierung der β -Catenin-Expression durch siRNA.

Die Zelllinien DLD1 und SW480 wurden mit verschiedenen siRNAs behandelt. Als Kontrollen dienten die siRNAs gegen β -Galaktosidase (si β gal#1, si β gal#2) und GFP (siGFP) sowie Zellen unter Standard-Kulturbedingungen (basal). 48h nach Transfektion wurden totale Zelllysate gewonnen. Im Western Blot wurde anschließend β -Catenin Protein detektiert. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung mit vergleichbaren Proteingesamtmenge wurde das Strukturprotein Actin nachgewiesen.

E.1.2 Zielgenvalidierung

Die im DNA Microarray-Experiment entdeckte Regulation der TNFRSF19 Expression durch β -Catenin haben wir mit Hilfe der quantitativen RT-PCR validiert. Nach Transfektion dreier β -Catenin siRNAs in DLD1- und SW480-Zellen wurden die TNFRSF19 mRNA-Spiegel bestimmt. Es bestätigte sich, dass die Herabregulation von β -Catenin zu erniedrigter TNFRSF19 Expression führt.

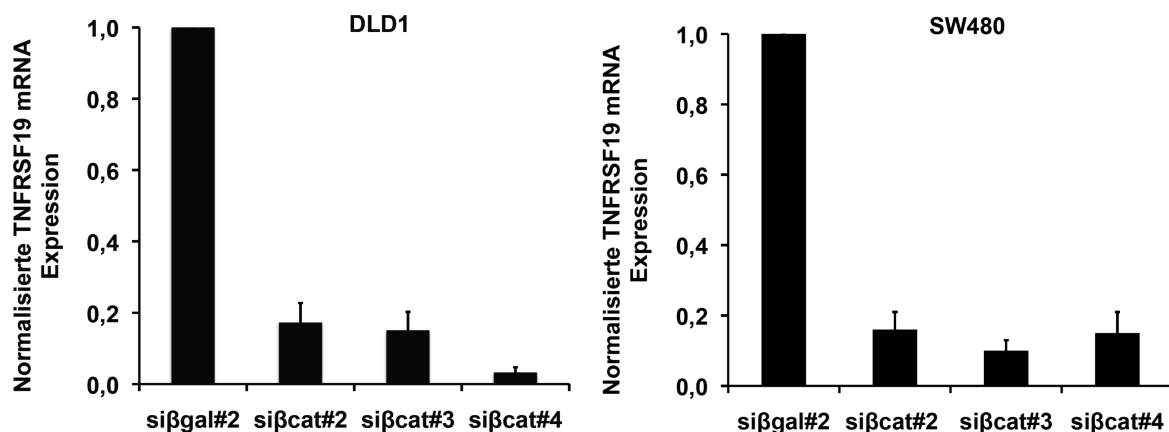


Abb. E.2 Bestätigung der Regulation von TNFRSF19 durch β -Catenin.

DLD1- und SW480-Zellen wurden mit siRNA gegen β -Catenin und als Kontrolle gegen β -Galaktosidase behandelt. Anschließend wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR die Expression von TNFRSF19 mRNA gemessen. Die Ct-Werte wurden gegen GAPDH normalisiert. Die relative Quantifizierung der deutlich reduzierten TNFRSF19 Expression wurde unter Anwendung der $\Delta\Delta$ Ct-Methode auf die Kontroll-siRNA (si β gal#2) bezogen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung und stammen aus Duplikaten.

E.2 Expressionsanalyse

E.2.1 Überexpression von TNFRSF19 in kolorektalen Karzinomzelllinien

Der Wnt-Signalweg ist in der Mehrzahl der Kolorektalkarzinom-Zelllinien aktiviert. Häufige Ursachen hierfür sind Mutationen im APC-Tumorsuppressorgen und der Verlust der Heterozygotität des noch intakten APC-Allels (engl. *loss of heterozygosity, LOH*) sowie auch Mutationen im CTNNB1-Gen (Sparks et al., 1998). In der Folge führt dies zur verstärkten Expression von β -Catenin/TCF4-Zielgenen. Nachdem wir die Regulation von TNFRSF19 durch β -Catenin mit Hilfe eines *knockdowns* von β -Catenin zeigen konnten, untersuchten wir daher, ob die Expression von TNFRSF19 in Kolorektalkarzinom-Zelllinien unter Basalbedingungen hochreguliert ist.

Dafür wurden die Zelllinien kultiviert und Gesamt-RNA isoliert. Anschließend wurde cDNA synthetisiert und die Expressionslevel von TNFRSF19 mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) auf mRNA-Ebene bestimmt. Die hierfür verwendeten Primer differenzierten nicht zwischen den beiden Isoformen.

Wie in Abbildung E.3 dargestellt zeigte sich, dass TNFRSF19 in 9 von 12 untersuchten Zelllinien im Vergleich zu Kolon-Normalgewebe deutlich überexprimiert wird. Die Zelllinie LoVo zeigte gleich starke Expressionspiegel wie das analysierte Normalgewebe. In den Zelllinien HT29 sowie RKO war auch nach 40 PCR-Zyklen kein spezifisches PCR-Produkt für TNFRSF19 nachweisbar.

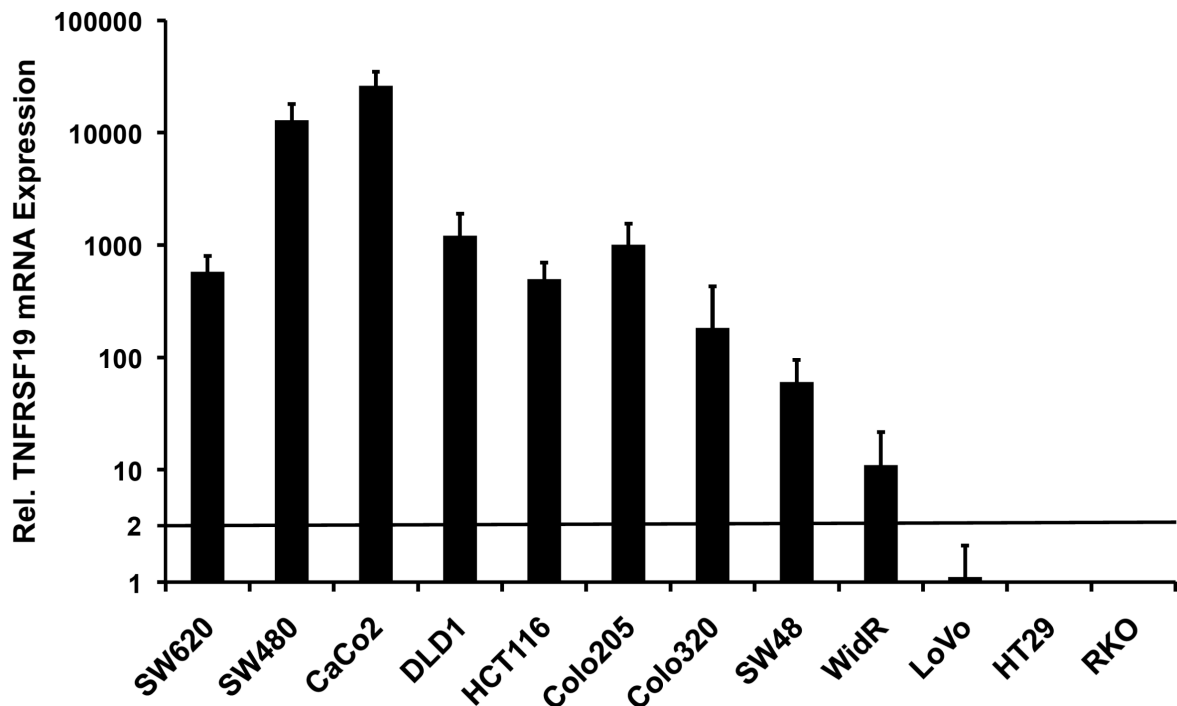


Abb. E.3 Überexpression von TNFRSF19 in kolorektalen Karzinomzelllinien.

Mittels qRT-PCR wurde die mRNA Expression von TNFRSF19 in 12 Zelllinien analysiert und mit Normalgewebe verglichen. Die gemessenen Ct-Werte wurden anhand der GAPDH Expression normalisiert. Nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode erfolgte eine relative Quantifizierung der TNFRSF19 Expression in Bezug auf die Expression in Kolon-Normalgewebe. Es zeigte sich eine teils deutliche Überexpression in 9 von 12 untersuchten Zelllinien. Als Grenzwert, ab dem wir von einer signifikanten Erhöhung der Expression ausgingen definierten wir einen Schwellenwert von mindestens Faktor 2, dargestellt durch eine horizontale Linie. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an aus Messungen mit Triplikaten.

E.2.2 Überexpression von TNFRSF19 in Gewebe aus primären Kolonkarzinomen

Um zu untersuchen, ob sich die Überexpression von TNFRSF19 mRNA auch in primären Kolonkarzinomen nachweisen lässt, wurden mikrodissesezierte Tumoren analysiert. Diese stammten aus histopathologisch bestätigten Fällen von Kolonkarzinomen. Als Kontrollen dienten Proben aus Kolonnormalgewebe derselben Patienten. Aus diesen Proben wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels qRT-PCR bestimmten wir die Expressionslevel der TNFRSF19 mRNA und verglichen die Spiegel in den Karzinomproben mit den jeweiligen Normalgewebeproben derselben Patienten. Die hierfür verwendeten Primer differenzierten nicht zwischen den beiden Isoformen.

Es zeigte sich, dass in 4 der 8 untersuchten Paare aus Karzinom- und Normalgewebe eine deutliche Überexpression von TNFRSF19 mRNA in den primären Karzinomen im Vergleich zum jeweiligen Normalgewebe vorlag (siehe Abb. E.4).

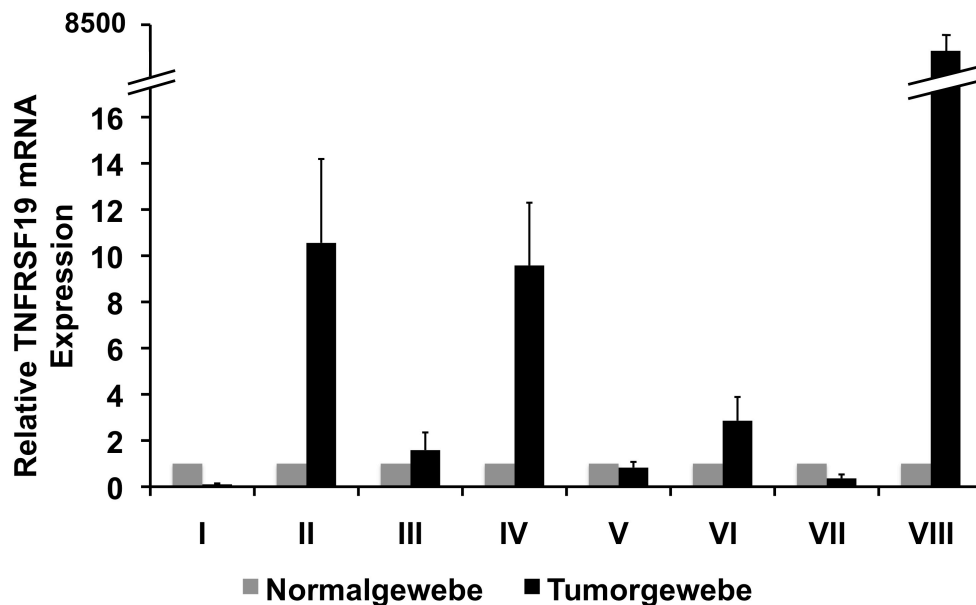


Abb. E.4 Überexpression von TNFRSF19 in primären Karzinomen. In der qRT-PCR wurde die mRNA Expression von TNFRSF19 in 8 Paaren von Gewebeproben untersucht. Diese stammten aus histopathologisch verifizierten primären Kolonkarzinomen sowie umliegendem Normalgewebe derselben Patienten. Die gemessenen Ct-Werte wurden jeweils auf die GAPDH Expression normalisiert. Mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode erfolgte eine relative Quantifizierung der TNFRSF19 Expression im Tumorgewebe in Bezug auf die Expression im Normalgewebe. In der Abbildung wurde der Expressionsspiegel im Normalgewebe jeweils auf 1 gesetzt und der Quotient aus der Expression im Tumorgewebe und entsprechendem Normalgewebe gebildet. Es fand sich eine Überexpression in 4 von 8 untersuchten Gewebeprobepaaren. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus Messungen mit Triplikaten an.

E.3 Charakterisierung des Promotors von TNFRSF19.1

E.3.1 Klonierung von Reportergenkonstrukten

In der Literatur wird eine differentielle Expression der beiden humanen Isoformen TNFRSF19.1 und TNFRSF19.2 berichtet. Qiu et al. (2010) zeigen in ihren Studien mit mesenchymalen Stammzellen, dass die Transkriptvariante TNFRSF19.2 ein direktes Wnt/ β -Catenin-Zielgen ist. Für TNFRSF19.1 konnten sie hingegen keine direkte Regulation nachweisen. Um die Regulation dieser Isoform durch β -Catenin weitergehend zu untersuchen, wählten wir daher einen Bereich aus dem Promotor von TNFRSF19.1, der im Gegensatz zu der Arbeit von Qiu et al. bis +5 Basenpaare hinter dem Start-ATG liegt und damit 173 Basenpaare weniger weit nach *downstream* reicht.

Um die Promotorregion von TNFRSF19.1 auf eine β -Catenin/TCF4-abhängige Aktivierung zu analysieren wurden Abschnitte der genomischen DNA *upstream* des Start ATG in den Luziferase-Reportervektor pGL3basic (Promega) kloniert. Für die Auswahl der Fragmente wurden die DNA-Sequenzen mithilfe der Software MatchX (<http://test-tube.info>, Administrator Andreas Herbst, Klinikum Großhadern) auf TCF4-Bindestellen nach dem Muster CTTTGWW, CTTTG CW, CTTTCWW, TTTTGWW (Tetsu and McCormick, 1999) untersucht, wobei der Buchstabe „W“ für die Base Adenin oder Thymin steht. Mit den in Tab. D.15 beschriebenen Primern wurden die entsprechenden PCR-Produkte synthetisiert. Anschließend wurden die Amplifikate ebenso wie die Vektor-DNA mit den Restriktionsenzymen MluI und HindIII (Fermentas) verdaut und die Konstrukte ligiert.

E.3.2 Konstrukte 1A – 1E

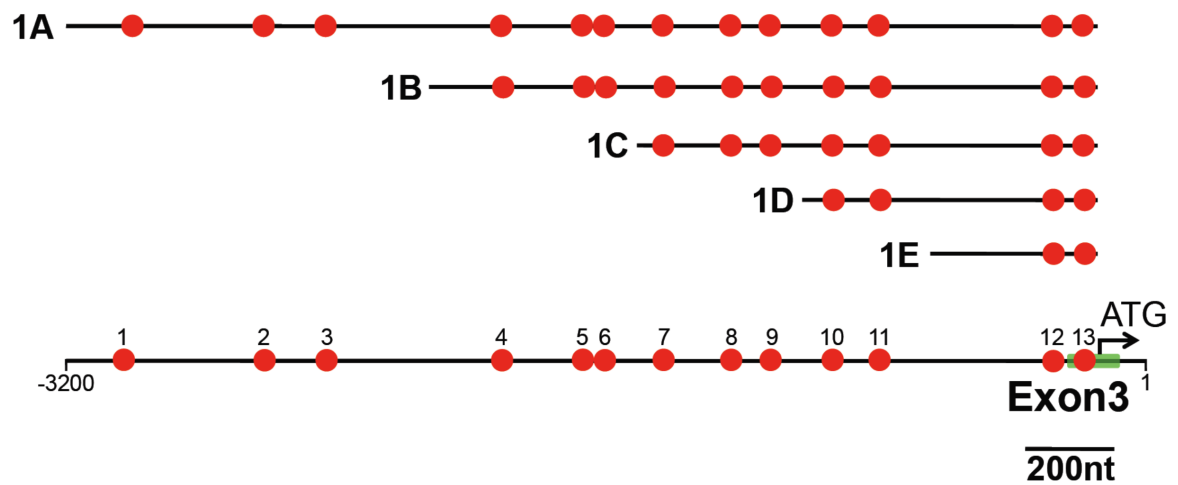


Abb. E.5 Übersicht über die Reportergenkonstrukte 1A bis 1E. Unterhalb der Fragmente ist der genomische DNA-Abschnitt des TNFRSF19.1-Promoters *upstream* des Start ATG dargestellt. Die Fragmente wurden vom 5'-Ende her fortlaufend verkürzt. Mit den nummerierten roten Punkte werden identifizierte kanonische TCF4-Bindestellen dargestellt. Die Sequenzen der einzelnen Bindestellen sind in Tabelle E.1 aufgelistet.

Tab. E.1

| Nummer der identifizierten TCF4-Bindestelle | Nukleotidsequenz |
|---|------------------|
| #1 | 5`-TTTTGAT-3` |
| #2 | 5`-TTTTGTT-3` |
| #3 | 5`-TAGAAAG-3` |
| #4 | 5`-ATCAAAG-3` |
| #5 | 5`-ATGAAAG-3` |
| #6 | 5`-TTCAAAG-3` |
| #7 | 5`-AACAAAG-3` |
| #8 | 5`-CTTTCTA-3` |
| #9 | 5`-TTTTGAT-3` |
| #10 | 5`-CTTTGCT-3` |
| #11 | 5`-TAGAAAG-3` |
| #12 | 5`-AACAAAG-3` |
| #13 | 5`-AAGAAAG-3` |

E.3.2.1 Konstrukte 1A – 1E im Reporteragen Assay

Für die Durchführung der Reporteragenassays wählten wir HEK293-Zellen, da diese im Gegensatz zu kolorektalen Karzinomzelllinien keine Deregelierung des Wnt-Signalweges aufweisen. Die auf dem Reportervektor kodierte Luziferase wird in Abhängigkeit von der Aktivität des Promotors exprimiert. Um Promotorregionen zu identifizieren, welche für die Transaktivierung durch β -Catenin/TCF4 relevant sind, verkürzten wir das ca. 3,2 kb lange Insert in 1A fortlaufend vom 5`-Ende bis zum 620 bp langen Insert in 1E. Damit β -Catenin als Transkriptionsfaktor agieren kann benötigt es Proteine aus der TCF-LEF-Familie. Wir kotransfizierten daher die Promotorfragmente zusammen mit Expressionsplasmiden für S33Y- β -Catenin sowie *full-length* TCF4 als Aktivatoren beziehungsweise pcDNA3-Leervektor als Kontrolle. Wie in Abbildung E.6 dargestellt, konnte die Expression der Luziferase bei allen Fragmenten um mindestens das 2-fache induziert werden. Als Kontrolle für die β -Catenin/TCF4-abhängige Transaktivierung wurde die Aktivierung des pTOPflash Reporters bei allen Reporteragen Assays untersucht (Abbildung E.7).

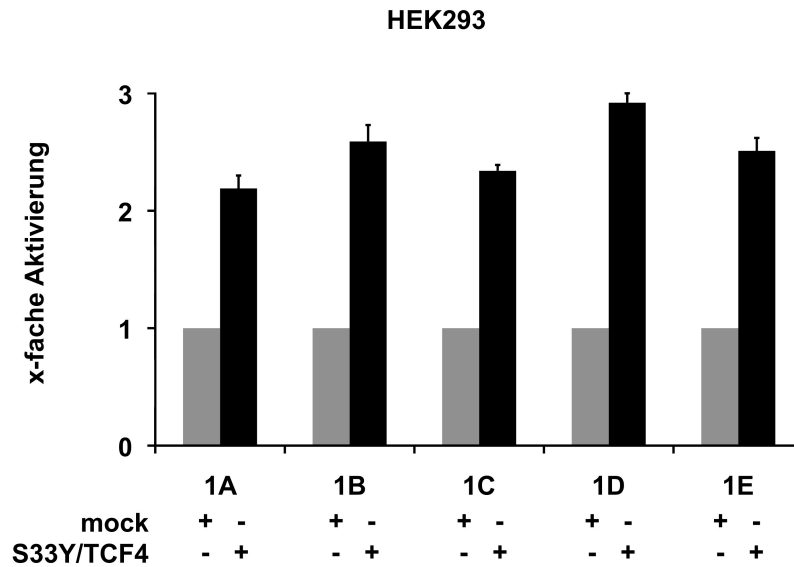
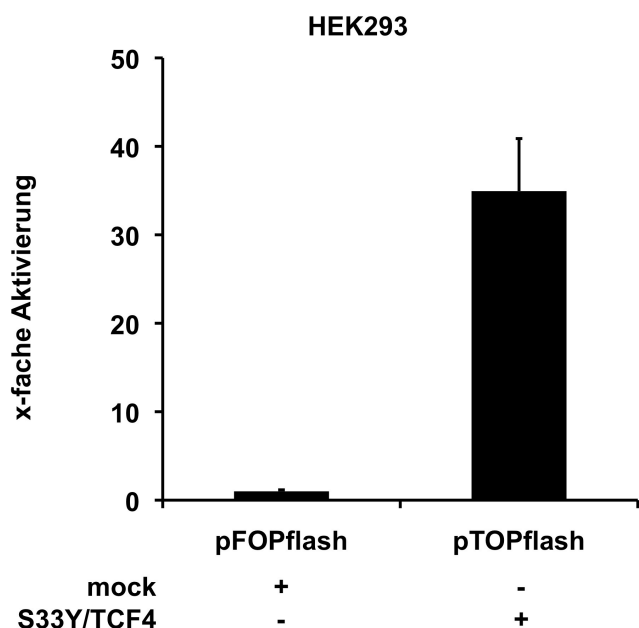


Abbildung E.6 TNFRSF19.1 Reportergenkonstrukte werden durch β -Catenin/TCF4 aktiviert. HEK293-Zellen wurden mit den oben beschriebenen Konstrukten transfiziert. Als Aktivatoren wurde S33Y- β -Catenin zusammen mit TCF4 kotransfiziert. Zur Kontrolle wurden Zellen mit pcDNA3-Leervektor transfiziert (als *mock* bezeichnet). 48h nach der Transfektion wurde die Luziferaseaktivität bestimmt und auf β -Galaktosidase normalisiert. Dargestellt ist die Ratio von aktivierten zu nicht-aktivierten Zellen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte aus Messungen von Duplikaten.

Abb. E.7 pTOPflash wird durch S33Y/TCF4 aktiviert. Analog zu dem in Abb. E.7 dargestellten Versuch wurden HEK293-Zellen mit dem Reportervektoren pTOPflash bzw pFopflash transfiziert und mit S33Y/TCF4 aktiviert. Zur Kontrolle wurden Zellen mit pcDNA3-Leervektor transfiziert (bezeichnet als *mock*). Dies diente bei sämtlichen Reportergen Assays als Positivkontrolle für die Aktivierung durch S33Y/TCF4.



E.3.3 Mutagenese der TCF4-Bindestellen im Fragment 1E

Mit den Reportergenkonstrukten 1A – 1E konnte gezeigt werden, dass β -Catenin/TCF4 die Promotorregionen des TNFRSF19.1 Gens aktiviert. Dabei war die Aktivität von Konstrukt 1E mit den beiden TCF4-Bindestellen #12 und #13 mindestens so hoch wie bei den längeren Fragmenten. Um die funktionelle Bedeutung dieser beiden TCF4-Bindestellen zu untersuchen generierten wir per zielgerichteter Mutagenese Konstrukte, bei denen diese Bindestellen einzeln oder in Kombination mutiert waren. Zunächst wurden die Bindestellen einzeln mutiert (Konstrukte 1E_mut12 und 1E_mut13). Für das Konstrukt 1E_mut12,13 wurde 1E_mut12 als Template in der PCR eingesetzt.

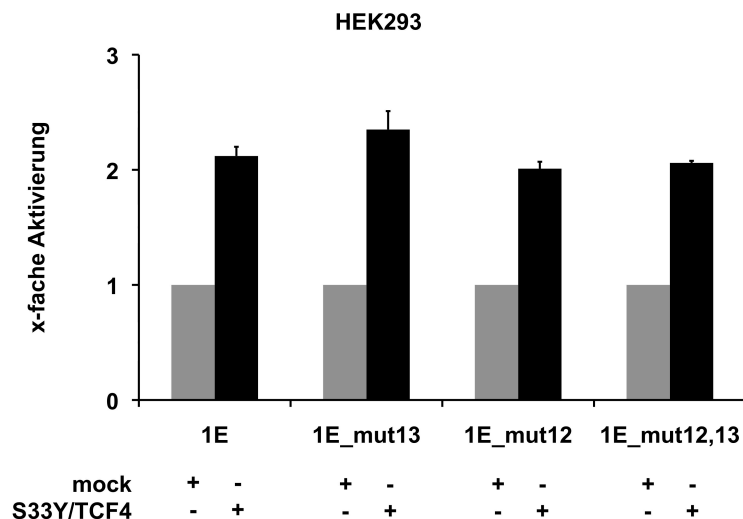
Tabelle E.2

| Nummer der mutierten TCF4-Bindestelle | ursprüngliche Sequenz | mutierte Sequenz | Mutagenese-Methode |
|---------------------------------------|-----------------------|------------------|-------------------------------|
| #12 | 5'-AACAAAG-3' | 5'-ACTAAAG-3' | zielgerichtete Mutagenese-PCR |
| #13 | 5'-AAGAAAG-3' | 5'-ACTAAAG-3' | |

E.3.3.1 Reportergen Assay mit den mutierten Konstrukten von 1E nach Kotransfektion von β -Catenin und TCF4

Die Mutationskonstrukte 1E_mut12, 1E_mut13 und 1E_mut12,13 wurden auf ihre Aktivierung durch S33Y- β -Catenin/TCF4 in HEK293-Zellen untersucht. Abbildung E.10 zeigt, dass alle drei Mutationskonstrukte eine deutliche Induktion der Luziferase-Aktivität aufweisen.

Abb. E.8 Mutagenese der TCF4-Bindestellen hat keinen Einfluß auf die Aktivität von 1E. Konstrukte mit mutierten Bindestellen wurden in HEK293-Zellen transfiziert. Aufbau und Auswertung des Versuchs waren identisch mit dem vorherigen Reporteragen Assay.



E.3.3.2 Reporteragen Assay mit den mutierten Konstrukten von 1E nach *knockdown* von β -Catenin in kolorektalen Karzinomzelllinien

Aufgrund einer APC-Mutation weisen die kolorektalen Karzinomzelllinien DLD1 und SW480 erhöhte Spiegel von aktivem β -Catenin im Zellkern auf. Mit siRNA, die gegen β -Catenin gerichtet ist, haben wir einen *knockdown* von β -Catenin Protein erreicht und im Western Blot nachgewiesen (siehe Abb. E.1). Um den Einfluß von β -Catenin auf die Promotorkonstrukte 1E und 1E_mut12,13 in kolorektalen Karzinomzelllinien zu analysieren, wurden die Reporteragenplasmide nach β -Catenin-*knockdown* transfiziert. Die Messung der Luziferase-Aktivität ergab, dass sowohl die Aktivität von 1E als auch von 1E_mut12,13 durch *Knockdown* von β -Catenin in kolorektalen Karzinomzelllinien deutlich reduziert wird. Allerdings zeigte das Konstrukt 1E_mut12,13 bereits in Gegenwart von siGal eine hohe Luziferase-Aktivität. Dies bestätigte die vorangegangenen Ergebnisse, wonach das Konstrukt 1E durch β -Catenin reguliert wird. Jedoch scheint dies unabhängig von den beiden identifizierten TCF-Bindestellen zu erfolgen.

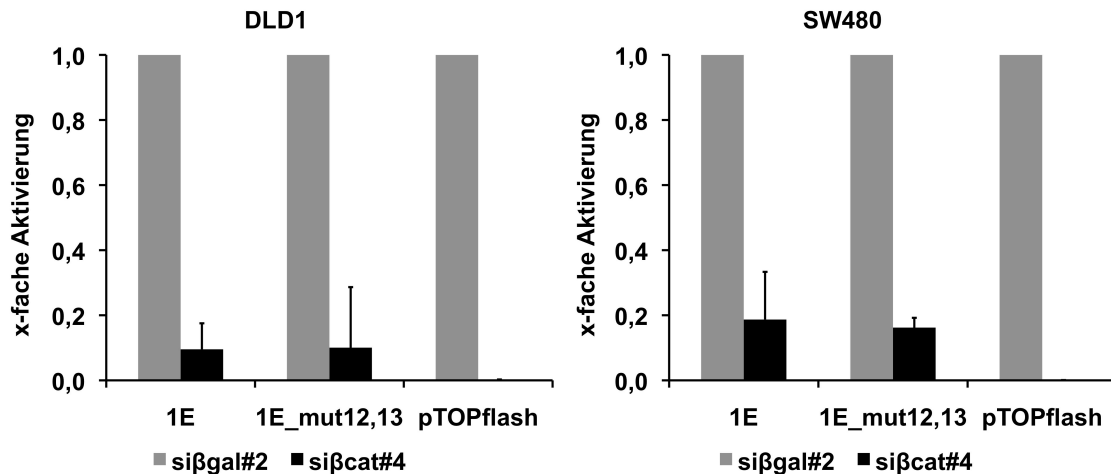


Abb. E.9 Die Aktivität von 1E und 1E_mut12,13 wird durch β -Catenin *knockdown* reduziert. SW480- und DLD1-Zellen wurden mit siRNA transfiziert, die gegen β -Catenin gerichtet ist (siβcat#4), und Kontroll-siRNA (siβgal#4). 24h später wurden die Reporter-genkonstrukte transfiziert. Nach weiteren 48h wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität gemessen und normalisiert. Für die graphische Darstellung wurde die Aktivität jeweils auf die Transfektion der Kontroll-siRNA bezogen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung und stammen aus Duplikaten.

E.3.4 Konstrukte 1Ea – 1Ee

Um die Promotorregion genauer zu definieren, welche für die β -Catenin/TCF4-abhängige Regulation von TNFRSF19.1 relevant ist, wurden 5 weitere Fragmente 1Ea – 1Ee ausgehend von Konstrukt 1E kloniert. Diese Reporter-genkonstrukte beinhalten jeweils ca. 120 bp des Inserts von Fragment 1E.

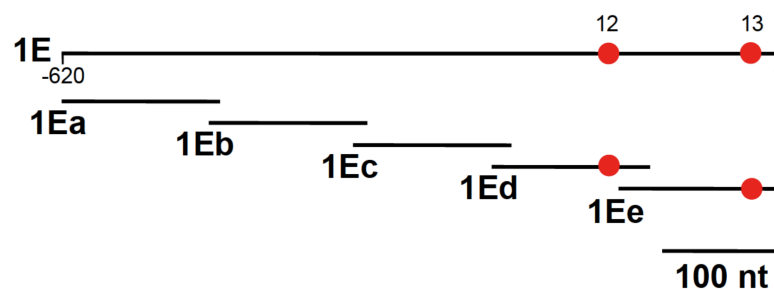


Abb. E.10 Schematische Übersicht der Konstrukte 1Ea – 1Ee.

E.3.4.1 Reportergen Assay mit den Konstrukten 1Ea – 1Ee nach Kotransfektion von β -Catenin und TCF4

Die Konstrukte 1Ea-1Ee wurden in HEK293-Zellen auf ihre Aktivierbarkeit durch transiente Transfektion von S33Y- β -Catenin und *full length* TCF4 untersucht. Als Referenz wurde das Reportergenkonstrukt 1E eingesetzt. Es zeigte sich nur bei dem Konstrukt 1Ee eine dem Referenz-Konstrukt 1E vergleichbar hohe basale Aktivität, die durch Kotransfektion von S33Y/TCF4 gesteigert werden konnte. Die übrigen *upstream* der Promoterregion von Konstrukt 1Ee liegenden Bereiche 1Ea – 1Ed wiesen hingegen im Vergleich hierzu nur minimale Aktivierungen auf.

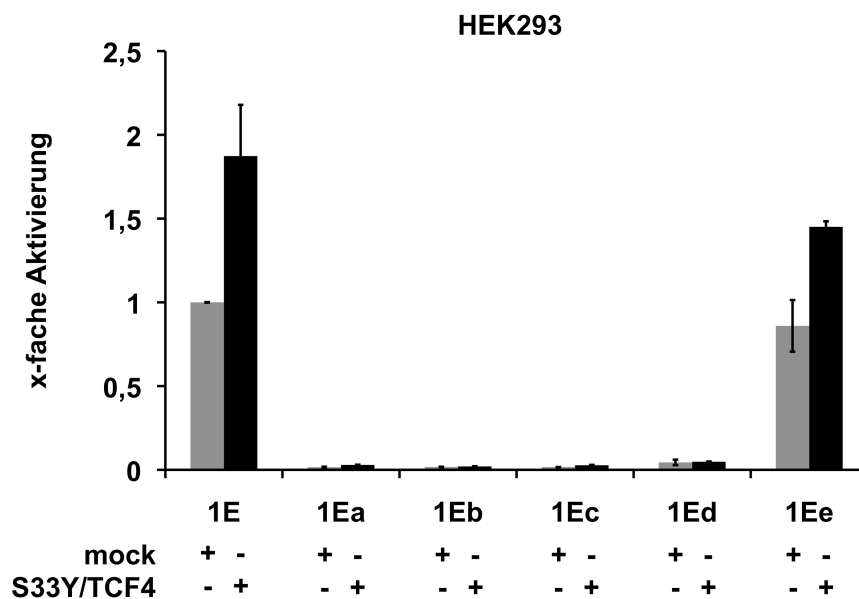


Abb. E.11 Von den Reportergenkonstrukten 1Ea – 1Ee zeigt nur 1Ee eine vergleichbare Aktivität wie 1E. HEK293-Zellen wurden kotransfiziert mit Reportergenkonstrukten und S33Y/TCF4 als Aktivatoren sowie pcDNA3-Leervektor als Kontrolle (bezeichnet als *mock*). 48h nach Transfektion wurden die Luziferaseaktivitäten bestimmt und normalisiert. Für die Darstellung wurde die Ratio gebildet aus jeweiliger normalisierter Aktivität und der basalen Aktivität des Referenzkonstruktes 1E. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung und stammen aus Duplikaten.

E.3.5 Mutationskonstrukte von 1Ee

Nachdem die Promotorregion von Konstrukt 1Ee als relevante Region für die Regulation von TNFRSF19.1 identifiziert worden war, untersuchten wir die funktionelle Bedeutung der darin enthaltenen kanonischen TCF4-Bindestelle. Durch Primer mit den entsprechenden Sequenzen wurden dafür 2 unterschiedliche Mutationen eingefügt sowie ein Konstrukt generiert, in dem die komplette Bindestelle deletiert wurde. Tabelle E.3 gibt einen Überblick über die mutierten Bindestellen.

Tabelle E. 3

| Bezeichnung des mutierten Konstruktes | ursprüngliche Sequenz der TCF4-Bindestelle #13 (unterstrichen) | mutierte Sequenz |
|---------------------------------------|--|---------------------|
| 1Ee_mut1 | 5'-GAT <u>AAGAAAG</u> ATG-3' | 5'-GAGCACTGCTATG-3' |
| 1Ee_mut2 | 5'-GAT <u>AAGAAAG</u> ATG-3' | 5'-GATAATCCCTATG-3' |
| 1Ee_del | 5'-GAT <u>AAGAAAG</u> ATG-3' | 5'-GAT(del)ATG-3' |

E.3.5.1 Reportergen Assay mit den mutierten Konstrukten von 1Ee nach Kotransfektion von β -Catenin und TCF4

Durch transiente Transfektion von S33Y- β -Catenin/TCF4 konnte bei den Konstrukten mit mutierten TCF4-Bindestellen eine vergleichbar hohe Luziferase-Aktivität erreicht werden wie bei dem deletierten Ausgangskonstrukt 1Ee (siehe Abb. E.12).

Somit scheinen die von uns identifizierten TCF4-Bindestellen keine funktionelle Bedeutung zu haben für die Aktivierbarkeit des Konstruktes 1Ee durch S33Y- β -Catenin/TCF4.

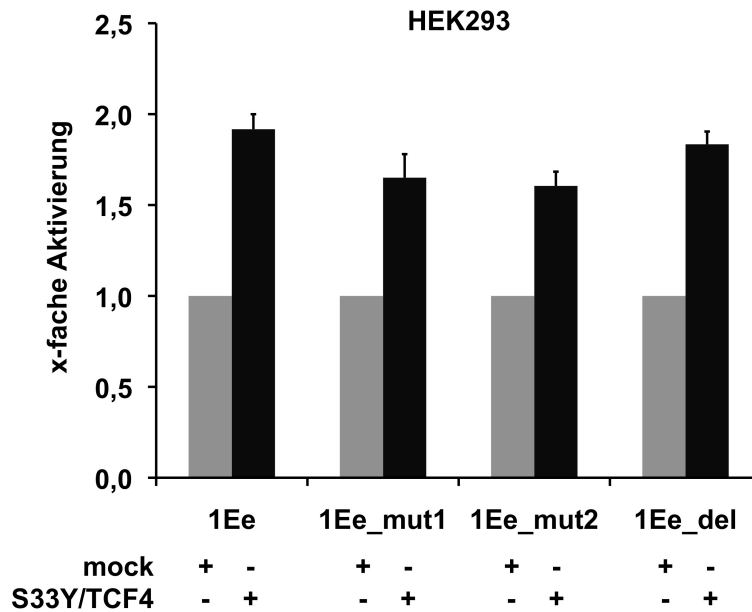


Abb. E.12 Mutationen und Deletion der TCF4-Bindestelle in Konstrukt 1Ee verhindert nicht die β -Catenin abhängige Aktivierung. Die mutierten Reportergenkonstrukte wurden in HEK293-Zellen transfiziert und mit S33Y/TCF4 stimuliert. 48h nach Transfektion wurde der Versuch ausgewertet. Bezugspunkt für die dargestellte Ratio war die jeweilige Luziferase-Aktivität bei Kotransfektion unter Kontrollbedingungen (Transfektion mit pcDNA3-Leervektor, bezeichnet als *mock*).

E.4 Einfluß von TNFRSF19 auf den NF- κ B-Signalweg

E.4.1 Klonierung und Überexpression von TNFRSF19.1 und TNFRSF19.2

Der Unterschied zwischen den beiden TNFRSF19 Isoformen TNFRSF19.1 und TNFRSF19.2 liegt auf Proteinebene am Carboxy-Terminus und wird in der Einleitung (B.4) genauer beschrieben. Wir klonierten die kompletten kodierenden Sequenzen (*coding sequence*, *CDS*) in den Expressionsvektor pcDNA3, um die Effekte einer transienten Überexpression auf die Luziferase-Aktivität eines NF- κ B-Reporters zu untersuchen.

E.4.2 Überexpression von TNFRSF19.1 und TNFRSF19.2 aktiviert den NF- κ B-Signalweg

Zur Bestimmung der Aktivität des NF- κ B-Signalweges diente das Reporterplasmid p106 (Arenzana-Seisdedos et al., 1997; Rust et al., 2006), auf dem das Luziferasegen unter der Kontrolle von κ B-Konsensusmotiven steht. Wird der NF- κ B-Signalweg aktiviert, führt dies zur verstärkten Bindung von NF- κ B-Proteinen an den Promotor und dadurch zu einer vermehrten Transkription der Luziferase. Die Luziferase-Aktivität wurde im Reporteragen Assay bestimmt.

Wir kotransfizierten die beiden Expressionsvektoren für TNFRSF19.1-HA bzw. TNFRSF19.2-HA zusammen mit dem NF- κ B Reporterplasmid p106 und maßen die Luziferase-Aktivität (Abb. E.13). Es zeigte sich, dass die sowohl die Überexpression von TNFRSF19.1 als auch von TNFRSF19.2 eine Induktion der NF- κ B-Aktivität um mehr als das 2-fache bewirkt.

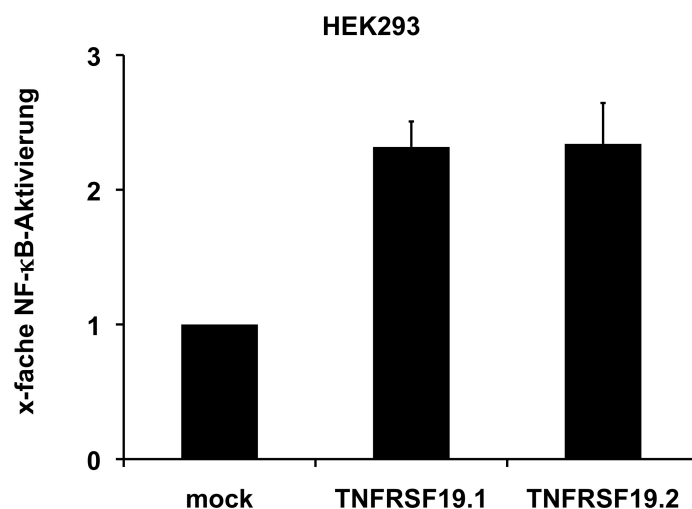


Abb. E.13 Überexpression von TNFRSF19.1 und TNFRSF19.2 aktiviert den NF- κ B-Signalweg. Wir transfizierten HEK293-Zellen mit dem Reporterplasmid p106 und den Expressionsvektoren für TNFRSF19.1 und TNFRSF19.2 sowie pcDNA3 als Kontrolle (*mock*). 48h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseexpression im Reporteragen Assay bestimmt. Die Luziferase-Werte wurden gegen β -Galaktosidase normiert und auf die basale Aktivität nach Leervektor-Transfektion bezogen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung und stammen aus Duplikaten.

E.4.3 *Knockdown* von TNFRSF19 reduziert die NF- κ B-Aktivität

Nachdem wir zeigen konnten, dass die Überexpression beider TNFRSF19 Isoformen die Aktivität des NF- κ B-Signalweges erhöht, untersuchten wir den Effekt eines siRNA-vermittelten *knockdown* von TNFRSF19. Dafür wurden 2 siRNAs eingesetzt, die beide Isoformen unabhängig voneinander herunterregulieren. Wir wählten hierfür die kolorektalen Karzinomzelllinien HCT116 und SW480 aus aufgrund ihrer starken Expression von TNFRSF19 mRNA (siehe Abb. E.3) aus. Um die Auswirkungen der siRNA-Transfektion auf die NF- κ B-Aktivität zu bestimmen wurde das Reporterplasmid p106 verwendet. Wie in Abb. E.14 dargestellt zeigte sich, dass die Herabregulation von TNFRSF19 durch beide siRNAs einzeln oder in Kombination zu einer deutlichen Reduktion der NF- κ B-Aktivität führte.

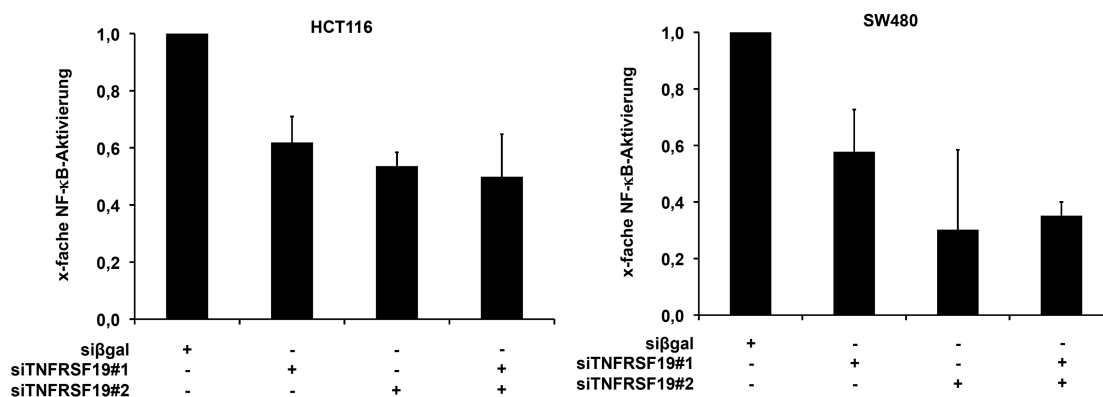


Abb. E.14 *Knockdown* von TNFRSF19 reduziert die NF- κ B-Aktivität in kolorektalen Karzinomzelllinien. HCT116- und SW480-Zellen wurden mit TNFRSF19 siRNA (siTNRSF19#1 und #2) und Kontroll-siRNA (si β gal) transfiziert. 24h später transfizierten wir das NF- κ B-Reporterplasmid. Nach insgesamt 72h wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität im Reporter-gen Assay gemessen und normalisiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung und stammen aus Duplikaten.

E.4.4 dnTNFRSF19 inhibiert die NF- κ B-Aktivität

Um die Interaktion zwischen TNFRSF19 und der Aktivität des NF- κ B-Signalweges weiter zu untersuchen, wurde eine dominant-negative TNFRSF19 Mutante (dnTNFRSF19-HA) generiert, bei welcher die extrazelluläre Domäne von TNFRSF19 vollständig fehlt.

Wie für die in Abb. E.14 beschriebenen *knockdown*-Versuche wurden die Zelllinien HCT116 und SW480 aufgrund der starken TNFRSF19 mRNA Expression ausgewählt, um den Effekt einer Überexpression der dominant-negativen Mutante auf die NF- κ B-Aktivität zu analysieren. Dafür transfizierten wir im 24-Well ansteigende Mengen Plasmid-DNA von dnTNFRSF19-HA und bestimmten mithilfe des p106-Reporterplasmides die Luziferase-Aktivität. In Abb. E.15 ist dargestellt, dass in beiden Zelllinien die Transfektion ansteigender Mengen Plasmid-DNA der dominant-negativen Variante von TNFRSF19 zu einer zunehmenden Reduktion der NF- κ B-Aktivität führt.

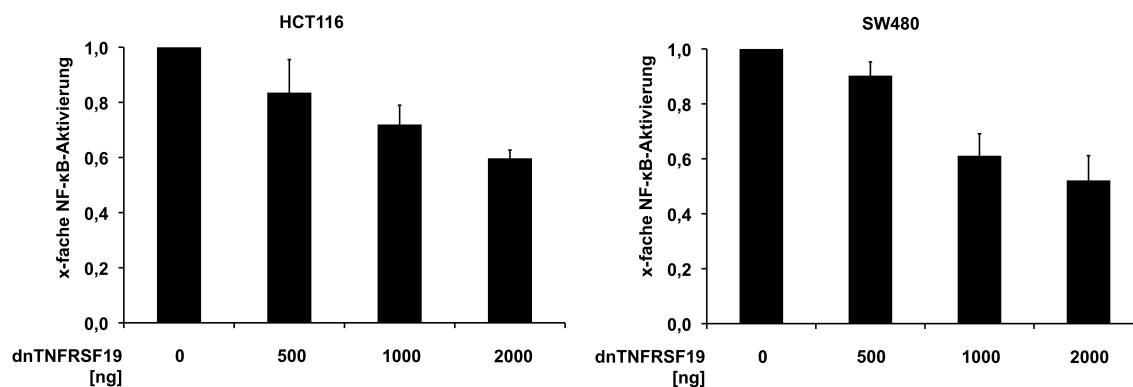


Abb. E.15. Überexpression von dominant-negativem TNFRSF19 senkt die NF- κ B-Aktivität in dosis-abhängiger Weise. HCT116- und SW480-Zellen wurden mit ansteigenden Mengen Plasmid-DNA des dominant-negativen Mutationskonstruktes dnTNFRSF19-HA transfiziert. Die Mengenangabe bezieht sich jeweils auf die Plasmid-DNA Menge pro Kavität im 24-Well. Unter Verwendung von pcDNA3-Leervektor wurden die jeweils transfizierten DNA-Mengen angeglichen. Zusätzlich transfizierten wir das NF- κ B-Reporterplasmid p106. Nach 48h wurden die Zellen geerntet und die Luziferase-Aktivität im Reporter-gen Assay gemessen und normalisiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung und stammen aus Duplikaten.

E.5 β -Catenin reguliert die NF- κ B-Aktivität

Wir konnten zeigen, dass β -Catenin/TCF4 die Expression von TNFRSF19 reguliert und der NF- κ B-Signalweg durch TNFRSF19 aktiviert wird. Um nun zu untersuchen, ob sich eine Interaktion zwischen dem Wnt-Signalweg und NF- κ B belegen lässt, haben wir das Reporterplasmid p106 in HEK293-Zellen transfiziert. Lithiumchlorid hemmt das Enzym Glykogen Synthase Kinase 3 β und damit den Abbau von β -Catenin. Auf diese Weise haben wir die Aktivität des endogenen β -Catenins stimuliert und gezeigt, dass sich so die NF- κ B-Aktivität um den Faktor 7 induzieren lässt (siehe hierzu die mit der Kontroll siRNA si β gal#2 transfizierten Proben in Abb. E.16). Um zu belegen, dass diese Induktion über β -Catenin und TNFRSF19 vermittelt wird, setzten wir neben der Kontroll-siRNA (si β gal#2) auch siRNAs gegen β -Catenin (si β cat#4) und TNFRSF19 (siTNFRSF19#2) ein. Während die mit der Kontroll-siRNA behandelten Zellen eine Aktivierung des NF- κ B-Signalweges nach Lithiumchlorid-Stimulation aufwiesen, konnten wir diese Induktion der NF- κ B-Aktivität sowohl mit der β -Catenin siRNA wie auch mit der TNFRSF19 siRNA auf etwa die Hälfte reduzieren (Abb. E.16). Hiermit habe ich gezeigt, dass die NF- κ B-Aktivität durch β -Catenin reguliert wird und gleichzeitig auch von der Expression des β -Catenin-Zielgens TNFRSF19 abhängig ist.

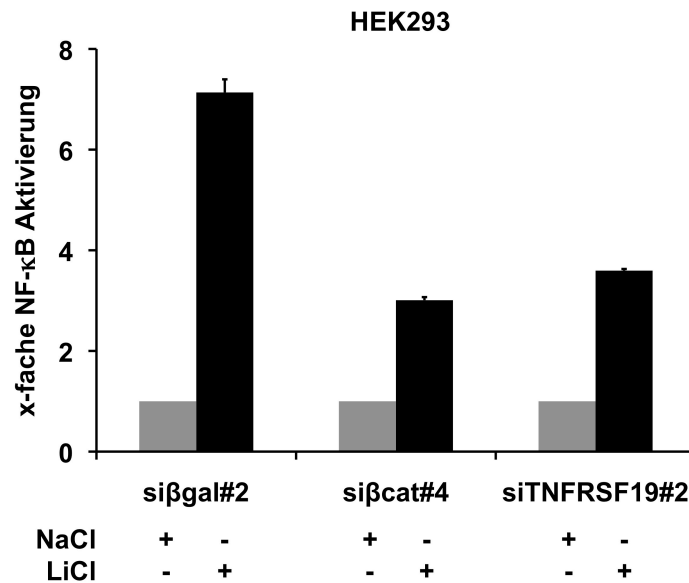


Abb. E.16 β -Catenin stimuliert die NF- κ B-Aktivität. *Knockdown* von β -Catenin und TNFRSF19 reduziert diese Aktivierung. HEK293-Zellen wurden mit siRNA gegen β -Galaktosidase (siβgal#2), β -Catenin (siβcat#4) und TNFRSF19 (siTNFRSF19#2) behandelt. Nach 6h transfizierten wir zudem das NF- κ B-Reporterplasmid p106. 24h danach wurden die Zellen mit 20mM Natriumchlorid als Kontrolle und 20mM Lithiumchlorid zur Erhöhung der endogenen β -Catenin-Spiegel stimuliert. Am dritten Tag wurden die Zellen geerntet, die Luziferase-Aktivität im Reporteragen Assay bestimmt und gegen β -Galaktosidase normalisiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung und stammen aus Duplikaten.

F Diskussion

F.1 Expression von TNFRSF19

In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnten wir mittels DNA Mikroarray-Experiment und anschließender Validierung der Ergebnisse in der qRT-PCR zeigen, dass TNFRSF19 ein Zielgen des Wnt-Signalweges in kolorektalen Karzinomzellen ist. Da der Wnt-Signalweg in der Mehrzahl der kolorektalen Karzinomzelllinien aktiv ist, erwarteten wir dort eine Hochregulation von TNFRSF19. Die durchgeführten Expressionanalysen ergaben, dass TNFRSF19 in 9 von 12 kolorektalen Karzinomzelllinien im Vergleich zu Kolon-Normalgewebe überexprimiert wird. Unter den 3 Zelllinien mit gleich starker oder nicht detektierbarer Expression zeichnet sich die *RKO*-Zelllinie interessanterweise dadurch aus, dass der Wnt-Signalweg in ihr nicht dereguliert ist. Die beobachtete Hochregulation konnte zudem durch Versuche mit mikrodissoziiertem Tumorgewebe aus primären Kolonkarzinomen bestätigt werden, bei denen sich in 4 von 8 Fällen im Vergleich zum Normalgewebe eine verstärkte TNFRSF19 mRNA Expression fand.

Die Karzinogenese wird angetrieben von einem andauernden Mutations- und Selektionsprozess. So wächst ein Tumor nur dann, wenn er beispielsweise die Abwehrmechanismen des Immunsystems überwinden kann. Aus diesem anhaltenden Selektionsdruck auf den Tumor resultiert die Proliferation derjenigen Tumorzellen, die durch charakteristische Mutationen im Vergleich zu den übrigen Zellen mehr wachstumsfördernde Eigenschaften erworben und -hemmende verloren haben. Daher lässt die deutliche Hochregulation von TNFRSF19 in der Mehrzahl der untersuchten Karzinomzelllinien und primären Kolonkarzinome im Vergleich zu gesundem Gewebe die Spekulation zu, dass die Expression von TNFRSF19 möglicherweise einen selektiven Wachstumsvorteil für maligne entartete Zellen bedeuten könnte. Dass TNFRSF19 einen Einfluss auf das Wachstum von Tumorzellen hat, konnte bereits von Spanjaard et al. (2007) für das maligne Melanom gezeigt werden.

Ferner wird diese These unterstützt durch beschriebene Expressionsanalysen in der Literatur, wonach die Expression von TNFRSF19 im gesunden Gewebe einer strikten Regulierung unterliegt. In Kolon, Dünndarm, Milz, Thymus, Uterus, Hoden und Leukozyten ist die Expression allenfalls gering und hohe Spiegel von TNFRSF19 ließen sich nur in der Prostata und dem Nervensystem nachweisen (Eby et al., 2000; Park et al., 2005; Shao et al.,

2005). Demgegenüber wird TNFRSF19 in verschiedenen Organsystemen während der Embryogenese stark exprimiert, was ebenfalls auf eine potenziell wachstumsfördernde Wirkung hindeutet (Hu et al., 1999; Kojima, 2000; Pispas et al., 2003). Als ein vorwiegend während der Embryonalentwicklung aktives Gen lässt sich zudem darüber spekulieren, ob seine Re-Expression auch zur Dedifferenzierung maligne transformierter Zellen beitragen könnte.

Dass die Expression von TNFRSF19 im kolorektalen Karzinom durch Wnt/ β -Catenin reguliert ist, konnten wir im DNA Mikroarray-Experiment zeigen und auch durch die Untersuchung des Promotors von TNFRSF19.1 bestätigen. Ein solcher Zusammenhang von Wnt-Aktivität und TNFRSF19 Expression wird ferner dadurch unterstrichen, dass während der Embryogenese der Wnt-Signalweg bekanntlich aktiv ist und hier auch von TNFRSF19 eine starke Expression beschrieben wurde. Passend dazu ist im Haarfollikel sowohl Wnt-Aktivität wie auch eine erhöhte Expression von TNFRSF19 nachgewiesen (Kojima, 2000; Kishimoto et al., 2000).

Darüber hinaus wird die Bedeutung der Expression von TNFRSF19 für Tumorzellen unterstrichen durch Untersuchungen bei Hirntumoren. Von Paulino et al. wurde 2010 berichtet, dass TNFRSF19 mRNA im normalen Hirngewebe nur auf niedrigem Level nachweisbar ist, jedoch die Expression im Tumorgewebe von malignen Glioblastomen signifikant erhöht ist und direkt korreliert mit ansteigenden Tumorgraden und erhöhter Mortalität.

F.2 Charakterisierung des Promotors von TNFRSF19.1

Bei der Charakterisierung des Promotors von TNFRSF19.1 konnten wir Bereiche identifizieren, die für die Regulation durch β -Catenin/TCF4 verantwortlich sind. Mit dem Nachweis der Aktivität auf dem Reportergenkonstrukt 1Ee wurde der für die Regulation relevante Bereich auf die Nukleotidsequenz -89 bis +5 (bezogen auf das Start-ATG bei 0) eingegrenzt. Die gezielte Mutagenese der von uns identifizierten kanonischen Bindestellen für TCF-Transkriptionsfaktoren resultierte in keiner Änderung der Luziferaseaktivität der Reportergenkonstrukte nach Stimulation durch β -Catenin/TCF4. Somit scheint die Transaktivierung des Promotors durch β -Catenin/TCF4 unabhängig von den untersuchten TCF-Bindestellen zu sein. Dafür kommen aus unserer Sicht mehrere Erklärungen in Frage. Zum einen ist eine indirekte Regulierung durch einen anderen Transkriptionsfaktor denkbar, der selbst ein β -Catenin-Zielgen ist. Als Beispiele hierfür seien die Transkriptionsfaktoren *c-myc*, *Sox9* und *c-jun* genannt, die als β -Catenin-Zielgene im kolorektalen Karzinom

beschrieben wurden (Ilyas, 2005). Des Weiteren besitzt β -Catenin viele weitere Interaktionspartner neben TCF4. So könnte β -Catenin für die Transaktivierung des TNFRSF19.1 Promotors auch andere Kofaktoren als TCF4 verwenden, wie z.B. LEF1. Ausserdem gibt es Verbindungen zu weiteren Signalwegen, unter anderem zum NF- κ B-Signalweg über die Proteine β -TrCP (Ougolkov et al., 2004) oder IKK- β (Lamberti, 2001). Prinzipiell sind auch bislang nicht identifizierte Varianten des hochkonservierten kanonischen TCF4 DNA-Motivs vorstellbar, die von uns nicht untersucht wurden.

In der Literatur wird ein indirekter Effekt von Wnt-Signalen auf die Regulation von TNFRSF19.1 ebenfalls von Qiu et al. (2010) vermutet. Sie beschreiben, dass die Expression von TNFRSF19.1 durch einen aktiven Wnt-Signalweg erhöht wird, konnten jedoch keine direkte Aktivierung des TNFRSF19.1 Promotors durch S33Y/TCF4 nachweisen. Zunächst untersuchten sie die TNFRSF19.1 Expression in humanen mesenchymalen Stammzelllinien, bei denen der Wnt-Korezeptor LRP5/6 durch gezielte Mutation entweder aktiviert (T253I-Mutation) oder inhibiert (L224M-Mutation) wurde. Nachdem diese Zelllinien durch konditioniertes Medium mit Wnt3a stimuliert wurden, zeigte sich in der Zelllinie mit dem aktiven Wnt-Rezeptor eine signifikante Erhöhung der TNFRSF19.1 Expression, jedoch in der Zelllinie mit dem defekten Wnt-Rezeptor unveränderte Spiegel. Anschließend klonierten sie ebenfalls ein Reportergenkonstrukt aus der mutmaßlichen Promotorregion von TNFRSF19.1 (von -1149 bis +178bp). Dieses wies unter basalen Bedingungen eine hohe transkriptionelle Aktivität auf, die sich jedoch durch Kotransfektion von S33Y/TCF4 nicht weiter stimulieren ließ. Daher nehmen die Autoren an, dass TNFRSF19.1 in humanen mesenchymalen Stammzellen unter basalen Bedingungen in Abhängigkeit von Wnt-Signalen bereits exprimiert wird. Aber da sie keine direkte Stimulation des TNFRSF19.1 Promotors durch S33Y- β -Catenin nachweisen konnte, postulieren sie eine mögliche indirekte Aktivierung. Eine weitere Publikation, die sich mit der differenziellen Expression der beiden Isoformen beschäftigte, stammt von Paulino und Kollegen (2010). Sie berichten darüber, dass TNFRSF19.2 im Glioblastoma multiforme überexprimiert wird, wohingegen von Isoform 1 keine erhöhten mRNA-Spiegel nachweisbar waren.

F.3 TNFRSF19 und der NF- κ B-Signalweg

Aufgrund seiner Zugehörigkeit zur TNF-Rezeptor-Superfamilie und einer TRAF2-Bindestelle wurde eine Interaktion von TNFRSF19 mit dem NF- κ B-Signalweg bereits in mehreren Publikationen untersucht (Hu et al., 1999; Eby et al., 2000; Kojima, 2000). Kojima gelang es

erstmalig zu zeigen, dass die Überexpression von muriner TNFRSF19 cDNA in humanen HEK293-Zellen die Aktivierung eines NF- κ B-abhängigen Reporters bewirkt. Mithilfe von murinen dominant-negativen Mutanten für TRAF2, 5 und 6 konnte in dieser Arbeit zudem gezeigt werden, dass diese Adapter-Proteine eine Rolle spielen bei der Signalvermittlung. Später stellten Hashimoto und Kollegen (2008) das Protein Lymphotoxin- α (LT- α) als potenziellen Liganden für TNFRSF19 vor. Sie verwendeten ebenfalls murine Expressionskonstrukte für TNFRSF19 und gelöstes LT- α -Protein, um deren Einfluss auf einen NF- κ B Reporter in humanen HEK293-Zellen zu analysieren. So beschrieben sie eine Induktion der NF- κ B-Aktivität durch Kotransfektion von murinem TNFRSF19 und LT- α sowie auch eine NF- κ B-Aktivierung durch Transfektion von murinem TNFRSF19 und anschließender Stimulation mit murinem LT- α -Protein.

Wir konnten in unseren Experimenten den Einfluß der TNFRSF19 Expression auf die Aktivität des NF- κ B-Signalweges bestätigen. Im Gegensatz zur bekannten Literatur untersuchten wir beide Isoformen und konnten erstmalig zeigen, dass die Überexpression beider humaner Isoformen in einer humanen Zelllinie zu einer Induktion des NF- κ B-Signalweges führt. Mittels eines siRNA-vermittelten *knockdown* von TNFRSF19 wurde von uns nachgewiesen, dass die NF- κ B-Aktivität in kolorektalen Karzinomzelllinien durch TNFRSF19 reguliert wird. Die Interaktion zwischen TNFRSF19 und NF- κ B-Signalweg in kolorektalen Karzinomzelllinien konnte zudem dadurch bestätigt werden, dass die Überexpression einer dominant-negativen Mutante von TNFRSF19 in HCT116- und SW480-Zellen zu einer deutlichen Reduktion der NF- κ B-Aktivität führte. Darüber hinaus gelang es uns zu belegen, dass β -Catenin über TNFRSF19 die Aktivität von NF- κ B regulieren kann.

In ihren Arbeiten spekulieren Paulino (2010) und Qiu (2010) darüber, dass sich die humanen Isoformen 1 und 2 in ihrer Fähigkeit, den NF- κ B-Signalweg zu aktivieren, unterscheiden könnten. Als Grund dafür vermuten sie, dass nur die Isoform 2 an ihrem Carboxyl-Terminus (Aminosäuren 413 – 416) eine konsensuelle *TNF receptor-associated factor (TRAF)*-Bindestelle SLQE besitzt, während diese bei Isoform 1 nicht vorhanden ist. Solche TRAF-Bindestellen können TRAF-Proteine rekrutieren, welche als Adaptor-Moleküle in der Folge NF- κ B- oder JNK-Signalwege aktivieren (Bradley and Pober, 2001). Aus meiner Sicht kann eine unterschiedliche Funktion der beiden Isoformen jedoch nicht einfach aus der bloßen Existenz dieser Bindestelle abgeleitet werden. Beim NF- κ B-Signalweg werden zwei Varianten unterschieden, nämlich der als klassische oder kanonische bezeichnete Weg und der sog. alternative oder nicht-kanonische Weg (Senftleben et al., 2001). Die Aktivierung über TRAF-Proteine betrifft in erster Linie den klassischen Signalweg, wohingegen der alternative Weg unabhängig von TRAFs aktiviert oder sogar negativ reguliert werden könnte (Xia and Chen, 2005). Somit bedingt die TRAF-Bindestelle der humanen Isoform 2

keinesfalls automatisch eine NF- κ B-Aktivierung. Denkbar wären nämlich sowohl eine negative Regulierung des alternativen Weges durch diese TRAF-Bindestelle wie auch eine Aktivierung von NF- κ B durch TNFRSF19.1 unabhängig von einer TRAF-Bindestelle.

F.4 Wnt/ β -Catenin und NF- κ B-Signalweg

Die Stimulation der Wnt-Aktivität in HEK293-Zellen führte zu einer Aktivierung des NF- κ B-Signalweges. Durch siRNA-vermittelte Herabregulierung von β -Catenin gelang es uns zu zeigen, dass diese Aktivierung β -Catenin-abhängig ist.

Bei der Betrachtung der Wechselwirkung dieser Signalwege muss berücksichtigt werden, dass beide auch in andere Signalweg-Netzwerke eingebunden sind. Somit bestehen weite Verzweigungen und Möglichkeiten der Interaktion (Du and Geller, 2010). Übereinstimmend zu unserer These, dass Wnt/ β -Catenin über die Expression von TNFRSF19 den NF- κ B-Signalweg positiv reguliert, ist der Bericht von Bandino und Kollegen (2008). Sie beschreiben eine NF- κ B-abhängige Hochregulation des Enzymes iNOS in Rattenhepatozyten nach einer Stimulation des Wnt-Signalweges durch Lithiumchlorid. Demgegenüber wurde jedoch auch ein hemmender Einfluß von β -Catenin auf den NF- κ B-Signalweg in CRC-Zelllinien berichtet (Deng et al., 2002; Du et al., 2009). Diese beiden Publikationen zeigen eine physikalische Interaktion von β -Catenin und den NF- κ B-Proteinen p65 und p50. Anschließend stimulierten sie die NF- κ B-Aktivität in HEK293-Zellen mit p65 oder TNF- α . Wurde nun noch S33Y- β -Catenin überexprimiert, so hatte dies eine hemmende Wirkung auf einen NF- κ B-Luziferase-Reporter nach Stimulation. Dazu belegen sie, dass hohe β -Catenin-Spiegel einen inhibierenden Einfluß haben auf die Expression von NF- κ B-Zielgenen. Bemerkenswerterweise wird jedoch nicht gezeigt, welchen Einfluß β -Catenin auf die basale Aktivität eines NF- κ B-Luziferase-Reporters hat, sondern nur der Zustand nach Stimulation mit TNF- α beschrieben. Dabei ist nicht ausgeschlossen, dass TNF- α weitere Signalwege und Kaskaden anstößt, die einen modulierenden Effekt haben auf die Aktivität des verwendeten Reportergens.

Aus unserer Sicht muss aufgrund der komplexen und weitverzweigten Interaktionen dieser Signalwege bei der Betrachtung möglicher Wechselwirkungen differenziert werden zwischen unterschiedlichen Funktionszuständen. So zeigen wir, dass der im kolorektalen Karzinom aktivierte Wnt-Signalweg zu einer Überexpression von TNFRSF19 führt. Dies hat einen verstärkenden Einfluß auf die basale Aktivität des NF- κ B-Signalweges. Daneben betonen wir die Möglichkeit weiterer direkter oder indirekter Interaktionen zwischen den Signalwegen, die

in Abhängigkeit des jeweiligen Aktivitätslevels und zellulären Kontextes sowohl positiv wie auch negativ korreliert sein könnten.

F.5 NF- κ B-Signalweg und kolorektales Karzinom

Ein Zusammenhang von chronischer Entzündung und malignen Erkrankungen ist seit langem bekannt und wurde in verschiedenen Kontexten untersucht (Balkwill and Mantovani, 2001). Im Verdauungstrakt sind vor allem die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn dafür bekannt, für Krebserkrankungen zu prädisponieren (Ullman and Itzkowitz, 2011). NF- κ B Transkriptionsfaktoren spielen eine zentrale Rolle bei der Koordinierung des Immunsystems und für die Initiierung und Aufrechterhaltung von Entzündungsreaktionen (Barnes and Karin, 1997). Auf molekularer Ebene stellen sie daher einen möglichen Mechanismus dar, durch welchen Entzündungen und Karzinogenese miteinander verbunden sein könnten (Karin, 2006; Naugler and Karin, 2008). Auch wenn die einzelnen Mechanismen noch unzureichend aufgeklärt sind, wurde die Beteiligung des NF- κ B-Signalweges an den wesentlichen Eigenschaften maligner Tumoren – autonomes Wachstum, Resistenz gegenüber apoptotischen Signalen, unbegrenzt replikatives Potential, Invasivität, Neo-Angiogenese – bereits in einer Vielzahl maligner Tumoren beschrieben. 2004 wurde so zum Beispiel über die fördernde Wirkung von NF- κ B auf die Promotion von Karzinomen in *Mdr2-knockout* Mäuse berichtet (Pikarsky et al., 2004). Auch für den Darmkrebs wurde die Rolle des NF- κ B-Signalweges mehrfach untersucht. Greten und Kollegen (2004) zeigten anhand eines Mausmodells für Colitis-assoziierte Karzinome, dass die Herabregulierung der NF- κ B-Aktivität durch Deletion der IKK β zu einem starken Rückgang der Tumorzinzidenz führt. Im selben Mausmodell wurden die Auswirkungen von DSS (*dextran sodium sulfate*)-induzierten Schleimhautverletzungen und Gabe von Azoxymethan nach Deletion von SOCS3 (*suppressors of cytokine signaling-3*) analysiert (Rigby et al., 2007). Neben einer Aktivierung von NF- κ B waren die Folgen eine Zunahme der Inzidenz, Größe und Gesamtumorlast. In einer weiteren Studie wird die Bedeutung von NF- κ B für inflammations-induziertes Tumorwachstum beschrieben (Luo et al., 2004). Das Wachstum von Kolonkarzinom-Metastasen ließ sich in dieser Arbeit in Abhängigkeit von aktivem NF- κ B durch Lipopolysaccharide (LPS) stimulieren. Wurde die NF- κ B-Aktivität in den Tumorzellen inhibiert, so führte dies zu einer Regression der Metastasen nach Gabe von LPS. Bemerkenswerterweise ist diese Regression abhängig von TRAIL, das wie TNFRSF19 aus der TNF-Rezeptor Superfamilie stammt.

Wie oben beschrieben konnten wir zeigen, dass β -Catenin über TNFRSF19 den NF- κ B-Signalweg in kolorektalen Karzinomzellen reguliert. Angesichts der vielfältigen und unterschiedlichen biologischen Effekte von NF- κ B auf Tumorzellen bedarf es weiterer Anstrengungen um zu untersuchen, welche spezifischen Funktion TNFRSF19 im kolorektalen Karzinom erfüllt.

F.6 Fazit

Wir haben gezeigt, dass das Rezeptormolekül TNFRSF19 im kolorektalen Karzinom verstärkt exprimiert wird. Zusammen mit den Daten zur Expression von TNFRSF19 in weiteren Tumorentitäten gibt dies Anlass zu der Vermutung, dass die exprimierende Tumorzelle hierdurch einen selektiven Wachstumsvorteil erwirbt.

Bei der Charakterisierung des Promotorbereiches von TNFRSF19.1 konnten wir einen engen Bereich definieren, der für eine Regulation durch β -Catenin/TCF4 verantwortlich ist. Die durchgeführten Mutationen der darin enthaltenen TCF4-Bindestellen zeigten keine Auswirkung auf die Aktivierbarkeit der Reportergenkonstrukte. Somit scheint ein entweder ein indirekter Weg der Regulation durch β -Catenin vorzuliegen, beispielsweise durch die Transkriptionsfaktoren *c-myc*, *Sox9* und *c-jun* genannt, die bekannte Wnt/ β -Catenin-Zielgene sind. Denkbar wären auch bislang unbekannte TCF4-Bindestellen oder weitere von β -Catenin benötigte Kofaktoren.

Wir konnten erstmals zeigen, dass die beiden humanen Isoformen TNFRSF19.1 und TNFRSF19.2 die NF- κ B-Aktivität stimulieren können. Damit stellt TNFRSF19 eine funktionelle Verbindung her zwischen dem Wnt-Signalweg und dem in erster Linie aus der Regulation des Immunsystems bekannten NF- κ B-Signalweg. Dass dieser auch an der molekularen Karzinogenese verschiedener Tumore beteiligt ist, wurde in der Literatur mehrfach gezeigt. Auch über Interaktionen zwischen NF- κ B- und Wnt-Signalweg existieren Berichte, wobei sowohl hemmende wie auch ein stimulierende Effekte gezeigt wurden. Diese Signalwege sind als komplexe Netzwerke aufgebaut mit intrinsischen Rückkopplungen und vielfältigen Wechselwirkungen zu anderen Signalwegen. Ein Mechanismus, bei dem die Änderung einer Größe zu einer konstanten und von anderen Faktoren unabhängigen Reaktion auf der anderen Seite führt, erscheint somit unmöglich. So ist auch die Bedeutung der β -Catenin-abhängigen NF- κ B-Aktivierung in kolorektalen Karzinomzellen durch TNFRSF19 vom zellulären Kontext und den Funktionszuständen weiterer Signalwege abhängig.

F.7 Ausblick

Die in dieser Dissertation vorgestellten Daten eröffnen eine Möglichkeit, wie Entzündungen und kolorektale Karzinogenese auf molekularer Ebene miteinander verbunden sein könnten. Es bedarf jedoch weiterer Experimente, um den Einfluß einer NF- κ B-Aktivierung durch TNFRSF19 auf die Entstehung und den Verlauf von kolorektalen Karzinomen genauer zu untersuchen und zu verstehen. *In vitro* könnte dafür beispielsweise zunächst die Expression von bekannten NF- κ B-Zielgenen analysiert werden. Allerdings unterliegen *in vitro*-Experimente bekanntermaßen prinzipiellen Einschränkungen. So sind z.B. Entzündungsreaktionen komplexe Geschehen, an deren Verlauf viele unterschiedliche Zelltypen und vielfältige Interaktionen beteiligt sind. Diese Bedingungen sind in Zellkulturversuchen nicht ausreichend nachzustellen. Hinzu kommt, dass die Effekte von chronischen Entzündungen bisweilen erst nach längeren Zeitintervallen auftreten. So würden *in vivo*-Modelle bessere Voraussetzungen bieten, um den Zusammenhang von aktivierten Entzündungs-mechanismen und Karzinogenese zu erforschen. Beispielsweise könnten in einem murinen TNFRSF19-Überexpressionsmodell verschiedene Entzündungsprozesse, die Aktivierung von Signalwegen sowie die Entstehung von Tumoren mit Hilfe von histologischen und immunhistochemischen Methoden untersucht werden. In *knock-out*-Modellen ließe sich der Einfluß von TNFRSF19 auf chemisch induzierte Entzündungen und die entzündungs-assoziierte Karzinogenese analysieren. Dafür könnten beispielsweise Tiere nach TNFRSF19-*knock-out* mit DSS (*dextran sodium sulfate*) oder TNBS (*2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid*) behandelt werden, um anschließend die Entstehung und Entwicklung von chronischen Entzündungen und Tumoren im Vergleich zu TNFRSF19-exprimierenden Kontrolltieren zu überwachen.

G Literaturverzeichnis

- Anastas, J.N., Moon, R.T., 2012. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nature Reviews Cancer* 13, 11–26.
- Arenzana-Seisdedos, F., Fernandez, B., Dominguez, I., Jacqu , J.M., Thomas, D., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J., Virelizier, J.L., 1993. Phosphatidylcholine hydrolysis activates NF-kappa B and increases human immunodeficiency virus replication in human monocytes and T lymphocytes. *J. Virol.* 67, 6596–6604.
- Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M., Thomas, D., Hay, R.T., Virelizier, J.L., Dargemont, C., 1997. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *Journal of cell science* 110, 369.
- Avasarala, J.R., Chittur, S.V., George, A.D., Tine, J.A., 2008. Microarray analysis in B cells among siblings with/without MS - role for transcription factor TCF2. *BMC Med Genomics* 1, 2.
- Balkwill, F., Mantovani, A., 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* 357, 539–545.
- Bandino, A., Compagnone, A., Bravoco, V., Cravanzola, C., Lomartire, A., Rossetto, C., Novo, E., Cannito, S., Valfr  di Bonzo, L., Zamara, E., Autelli, R., Parola, M., Colombatto, S., 2008. Beta-catenin triggers nuclear factor kappaB-dependent up-regulation of hepatocyte inducible nitric oxide synthase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1861–1871.
- Barnes, P.J., Karin, M., 1997. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* 336, 1066–1071.
- Bei, J.-X., Li, Y., Jia, W.-H., Feng, B.-J., Zhou, G., Chen, L.-Z., Feng, Q.-S., Low, H.-Q., Zhang, H., He, F., Tai, E.S., Kang, T., Liu, E.T., Liu, J., Zeng, Y.-X., 2010. A genome-wide association study of nasopharyngeal carcinoma identifies three new susceptibility loci. *Nat. Genet.* 42, 599–603.
- Bienz, M., Clevers, H., 2000. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103, 311–320.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bradley, J.R., Pober, J.S., 2001. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 20, 6482–6491.
- Brantjes, H., Barker, N., van Es, J., Clevers, H., others, 2002. TCF: Lady Justice casting the final verdict on the outcome of Wnt signalling. *Biological chemistry* 383, 255–262.
- Chan, A.T., Giovannucci, E.L., 2010. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology* 138, 2029–2043.e10.
- Cheng, Y.-W., Pincas, H., Bacolod, M.D., Schemmann, G., Giardina, S.F., Huang, J., Barral, S., Idrees, K., Khan, S.A., Zeng, Z., Rosenberg, S., Notterman, D.A., Ott, J., Paty, P., Barany, F., 2008. CpG island methylator phenotype associates with low-degree chromosomal abnormalities in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 6005–6013.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Clevers, H., 2004. At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell* 118, 671–674.

- Clevers, H., 2006. Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* 127, 469–480.
- De Toni, E.N., Thieme, S.E., Herbst, A., Behrens, A., Stieber, P., Jung, A., Blum, H., Göke, B., Kolligs, F.T., 2008. OPG is regulated by beta-catenin and mediates resistance to TRAIL-induced apoptosis in colon cancer. *Clinical cancer research* 14, 4713–4718.
- Deng, J., Miller, S.A., Wang, H.-Y., Xia, W., Wen, Y., Zhou, B.P., Li, Y., Lin, S.-Y., Hung, M.-C., 2002. beta-catenin interacts with and inhibits NF-kappa B in human colon and breast cancer. *Cancer Cell* 2, 323–334.
- Du, Q., Geller, D.A., 2010. Cross-Regulation Between WNT and NF-kappaB Signaling Pathways, in: *Forum on Immunopathological Diseases and Therapeutics*. p. 155.
- Du, Q., Zhang, X., Cardinal, J., Cao, Z., Guo, Z., Shao, L., Geller, D.A., 2009. Wnt/ -Catenin Signaling Regulates Cytokine-Induced Human Inducible Nitric Oxide Synthase Expression by Inhibiting Nuclear Factor- B Activation in Cancer Cells. *Cancer Research* 69, 3764–3771.
- Eby, M.T., Jasmin, A., Kumar, A., Sharma, K., Chaudhary, P.M., 2000. TAJ, a novel member of the tumor necrosis factor receptor family, activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and mediates caspase-independent cell death. *J. Biol. Chem.* 275, 15336–15342.
- Ekbom, A., Helmick, C., Zack, M., Adami, H.O., 1990. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N. Engl. J. Med.* 323, 1228–1233.
- Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M., Boyle, P., 2007. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann. Oncol.* 18, 581–592.
- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M., 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer* 127, 2893–2917.
- Fodde, R., Smits, R., Clevers, H., 2001. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 55–67.
- Geiersbach, K.B., Samowitz, W.S., 2011. Microsatellite instability and colorectal cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135, 1269–1277.
- Greten, F.R., Eckmann, L., Greten, T.F., Park, J.M., Li, Z.-W., Egan, L.J., Kagnoff, M.F., Karin, M., 2004. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118, 285–296.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hashimoto, T., Schlessinger, D., Cui, C.Y., 2008. Troy binding to lymphotoxin-alpha activates NFkB mediated transcription. *Cell Cycle* 7, 106–111.
- Heath, J.P., 1996. Epithelial cell migration in the intestine. *Cell Biol. Int.* 20, 139–146.
- Herbst, A., Bommer, G.T., Kriegl, L., Jung, A., Behrens, A., Csanadi, E., Gerhard, M., Bolz, C., Riesenberger, R., Zimmermann, W., Dietmaier, W., Wolf, I., Brabletz, T., Göke, B., Kolligs, F.T., 2009. ITF-2 Is Disrupted via Allelic Loss of Chromosome 18q21, and ITF-2B Expression Is Lost at the Adenoma-Carcinoma Transition. *Gastroenterology* 137, 639–648.e9.
- Hisaoka, T., 2003. Expression of a member of tumor necrosis factor receptor superfamily, TROY, in the developing mouse brain. *Developmental Brain Research* 143, 105–109.
- Hu, S., Tamada, K., Ni, J., Vincenz, C., Chen, L., 1999. Characterization of TNFRSF19, a novel member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Genomics* 62, 103–107.
- Ilyas, M., 2005. Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. *The Journal of Pathology* 205, 130–144.
- Ionov, Y., Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Shibata, D., Perucho, M., 1993. Ubiquitous

somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363, 558–561.

Issa, J.-P., 2008. Colon Cancer: It's CIN or CIMP. *Clinical Cancer Research* 14, 5939–5940.

Itzkowitz, S.H., Yio, X., 2004. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287, G7–17.

Jass, J.R., 2006. Colorectal cancer: a multipathway disease. *Critical reviews in oncogenesis* 12, 273–288.

Jass, J.R., 2007. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50, 113–130.

Jass, J.R., Whitehall, V.L.J., Young, J., Leggett, B.A., 2002. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 123, 862–876.

Jones, S.E., Jomary, C., 2002. Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays* 24, 811–820.

Karin, M., 2006. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature* 441, 431–436.

Karin, M., Lawrence, T., Nizet, V., 2006. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 124, 823–835.

Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159–170.

Kishimoto, J., Burgeson, R.E., Morgan, B.A., 2000. Wnt signaling maintains the hair-inducing activity of the dermal papilla. *Genes Dev.* 14, 1181–1185.

Kojima, T., 2000. TROY, a Newly Identified Member of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Exhibits a Homology with Edar and Is Expressed in Embryonic Skin and Hair Follicles. *Journal of Biological Chemistry* 275, 20742–20747.

Kolligs, F.T., Kolligs, B., Hajra, K.M., Hu, G., Tani, M., Cho, K.R., Fearon, E.R., 2000. gamma-catenin is regulated by the APC tumor suppressor and its oncogenic activity is distinct from that of beta-catenin. *Genes Dev.* 14, 1319–1331.

Kong, M., Kim, Y., Lee, C., 2011. A strong synergistic epistasis between FAM134B and TNFRSF19 on the susceptibility to vascular dementia. *Psychiatr. Genet.* 21, 37–41.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Lamberti, C., 2001. Regulation of beta -Catenin Function by the Ikappa B Kinases. *Journal of Biological Chemistry* 276, 42276–42286.

Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M.J., Albrecht, U., Behringer, R.R., Bradley, A., 1999. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat. Genet.* 22, 361–365.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408.

Luo, J.L., Maeda, S., Hsu, L.C., Yagita, H., Karin, M., 2004. Inhibition of NF-[kappa] B in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNF [alpha] to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer cell* 6, 297–305.

Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr, G.H., 3rd, Flynn, C., Yuan, H., Takada, S., Kimelman, D., Li, L., Wu, D., 2001. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol. Cell* 7, 801–809.

Mi, S., 2008. Troy/Taj and its role in CNS axon regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19, 245–251.

- Migliore, L., Migheli, F., Spisni, R., Coppedè, F., 2011. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 792362.
- Morin, P.J., 1999. beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays* 21, 1021–1030.
- Naugler, W.E., Karin, M., 2008. NF- κ B and cancer—identifying targets and mechanisms. *Current Opinion in Genetics & Development* 18, 19–26.
- Niemann, S., Zhao, C., Pascu, F., Stahl, U., Aulepp, U., Niswander, L., Weber, J.L., Müller, U., 2004. Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 558–563.
- Nusse, R., Brown, A., Papkoff, J., Scambler, P., Shackleford, G., McMahon, A., Moon, R., Varmus, H., 1991. A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell* 64, 231.
- Nusse, R., Varmus, H.E., 1982. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31, 99–109.
- Ougolkov, A., Zhang, B., Yamashita, K., Bilim, V., Mai, M., Fuchs, S.Y., Minamoto, T., 2004. Associations among beta-TrCP, an E3 ubiquitin ligase receptor, beta-catenin, and NF-kappaB in colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 1161–1170.
- Park, J.B., Yiu, G., Kaneko, S., Wang, J., Chang, J., He, X.L., Garcia, K.C., He, Z., 2005. A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron* 45, 345–351.
- Paulino, V.M., Yang, Z., Kloss, J., Ennis, M.J., Armstrong, B.A., Loftus, J.C., Tran, N.L., 2010. TROY (TNFRSF19) is overexpressed in advanced glial tumors and promotes glioblastoma cell invasion via Pyk2-Rac1 signaling. *Molecular Cancer Research* 8, 1558.
- Pino, M.S., Chung, D.C., 2010. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 138, 2059–2072.
- Pispa, J., Mikkola, M.L., Mustonen, T., Thesleff, I., 2003. Ectodysplasin, Edar and TNFRSF19 are expressed in complementary and overlapping patterns during mouse embryogenesis. *Gene Expression Patterns* 3, 675–679.
- Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 1992. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359, 235–237.
- Pühler, A., Regitz, M., Schmid, R., 2000. Römpp Kompakt Lexikon: Biochemie und Molekularbiologie. Georg Thieme, Stuttgart; New York.
- Qiu, W., Hu, Y., Andersen, T.E., Jafari, A., Li, N., Chen, W., Kassem, M., 2010. Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 19 (TNFRSF19) Regulates Differentiation Fate of Human Mesenchymal (Stromal) Stem Cells through Canonical Wnt Signaling and C/EBP. *Journal of Biological Chemistry* 285, 14438–14449.
- Rigby, R.J., Simmons, J.G., Greenhalgh, C.J., Alexander, W.S., Lund, P.K., 2007. Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) limits damage-induced crypt hyper-proliferation and inflammation-associated tumorigenesis in the colon. *Oncogene* 26, 4833–4841.
- Rostom, A., Dubé, C., Lewin, G., Tsertsvadze, A., Barrowman, N., Code, C., Sampson, M., Moher, D., 2007. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors for primary prevention of colorectal cancer: a systematic review prepared for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann. Intern. Med.* 146, 376–389.
- Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132, 365–386.
- Rust, C., Bauchmuller, K., Bernt, C., Vennegeerts, T., Fickert, P., Fuchsbichler, A., Beuers, U., 2006. Sulfasalazine reduces bile acid induced apoptosis in human hepatoma cells and

perfused rat livers. *Gut* 55, 719–727.

Satoh, J., Tabunoki, H., Yamamura, T., Arima, K., Konno, H., 2007. TROY and LINGO-1 expression in astrocytes and macrophages/microglia in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33, 99–107.

Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krähn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C., Karin, M., 2001. Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293, 1495–1499.

Shao, Z., Browning, J.L., Lee, X., Scott, M.L., Shulga-Morskaya, S., Allaire, N., Thill, G., Levesque, M., Sah, D., McCoy, J.M., Murray, B., Jung, V., Pepinsky, R.B., Mi, S., 2005. TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration. *Neuron* 45, 353–359.

Sinicropo, F.A., Rego, R.L., Halling, K.C., Foster, N., Sargent, D.J., La Plant, B., French, A.J., Laurie, J.A., Goldberg, R.M., Thibodeau, S.N., Witzig, T.E., 2006. Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. *Gastroenterology* 131, 729–737.

Spanjaard, R.A., Whren, K.M., Graves, C., Bhawan, J., 2007. Tumor necrosis factor receptor superfamily member TROY is a novel melanoma biomarker and potential therapeutic target. *International journal of cancer* 120, 1304–1310.

Sparks, A.B., Morin, P.J., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 1998. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer research* 58, 1130.

Tam, S.J., Richmond, D.L., Kaminker, J.S., Modrusan, Z., Martin-McNulty, B., Cao, T.C., Weimer, R.M., Carano, R.A.D., van Bruggen, N., Watts, R.J., 2012. Death Receptors DR6 and TROY Regulate Brain Vascular Development. *Dev. Cell* 22, 403–417.

Tetsu, O., McCormick, F., 1999. beta-Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422–426.

Tischoff, I., Tannapfel, A., 2008. [Epigenetic alterations in colorectal carcinomas and precancerous lesions]. *Z Gastroenterol* 46, 1202–1206.

Ullman, T.A., Itzkowitz, S.H., 2011. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* 140, 1807–1816.

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., Bos, J.L., 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319, 525–532.

Vogelstein, B., Gillespie, D., 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 615–619.

Wang, Y., Li, X., Wang, L., Ding, P., Zhang, Y., Han, W., Ma, D., 2004. An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered by TAJ/TROY and enhanced by PDCD5 overexpression. *Journal of cell science* 117, 1525.

Weisenberger, D.J., Siegmund, K.D., Campan, M., Young, J., Long, T.I., Faasse, M.A., Kang, G.H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., Koh, H., Simms, L., Barker, M., Leggett, B., Levine, J., Kim, M., French, A.J., Thibodeau, S.N., Jass, J., Haile, R., Laird, P.W., 2006. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat. Genet.* 38, 787–793.

Winawer, S.J., Zauber, A.G., O'Brien, M.J., Ho, M.N., Gottlieb, L., Sternberg, S.S., Waye, J.D., Bond, J., Schapiro, M., Stewart, E.T., 1993. Randomized comparison of surveillance intervals after colonoscopic removal of newly diagnosed adenomatous polyps. The National Polyp Study Workgroup. *N. Engl. J. Med.* 328, 901–906.

Winer, J., Jung, C.K., Shackel, I., Williams, P.M., 1999. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene

expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal. Biochem.* 270, 41–49.

Xia, Z.P., Chen, Z.J., 2005. TRAF2: a double-edged sword. *Sci STKE* 272, 7–9.

Young, J., Jenkins, M., Parry, S., Young, B., Nancarrow, D., English, D., Giles, G., Jass, J., 2007. Serrated pathway colorectal cancer in the population: genetic consideration. *Gut* 56, 1453–1459.

Eidesstattliche Versicherung**Schön, Simon Tobias**Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**TNFRSF19 als Zielgen des Wnt/ β -Catenin-Signalweges im kolorektalen Karzinom:
Untersuchungen zu Expression, Regulation und Funktion**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand